



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

VIVIANE DE OLIVEIRA NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FUNCIONAIS E MOLECULARES INDUZIDOS PELA
DESNUTRIÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE FÍSICA MATERNA SOBRE O
CONTROLE DA ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA E VENTILAÇÃO EM RATOS
JOVENS**

Recife
2019

VIVIANE DE OLIVEIRA NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FUNCIONAIS E MOLECULARES INDUZIDOS PELA
DESNUTRIÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE FÍSICA MATERNA SOBRE O
CONTROLE DA ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA E VENTILAÇÃO EM RATOS
JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Bases experimentais da nutrição.

Orientador: Profº. Dr. João Henrique da Costa Silva.

Coorientador: Profº. Dr. Carol Virginia Gois Leandro.

Recife
2019

Catálogo na fonte:

bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

N778a Nogueira, Viviane de Oliveira.
Avaliação dos efeitos funcionais e moleculares induzidos pela desnutrição proteica e atividade física materna sobre o controle da atividade nervosa simpática e ventilação em ratos jovens / Viviane de Oliveira Nogueira. – Recife: o autor, 2019.
124 f.; il.; 30 cm.

Orientador: João Henrique da Costa Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências, apêndices e apêndices.

1. Frequência respiratória. 2. Pressão sanguínea. 3. Ratos. I. Silva, João Henrique da Costa (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 102)

VIVIANE DE OLIVEIRA NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FUNCIONAIS E MOLECULARES INDUZIDOS PELA
DESNUTRIÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE FÍSICA MATERNA SOBRE O
CONTROLE DA ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA E VENTILAÇÃO EM RATOS
JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em:12/04/2019

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. João Henrique da Costa Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Carol Virginia Gois Leandro (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. David Filipe de Santana (Examinadora Externo)
Faculdade Escritor Osman da Costa Lins

Profº. Dr. José Luiz de Brito Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Profº. Dr. . Monique Assis de Vasconcelos Barros (Examinador Externo)

Ao meu filho, Arthur Souza!

Faz tão pouco tempo que você chegou à minha vida e mesmo assim já conseguiu mudar todo meu mundo, para melhor.

Tenho muitos sonhos para você e para nós, mas o que mais quero é ver você crescer forte, feliz e saudável.

Enquanto tiver vida e forças vou proteger você e lutar pela sua felicidade, isso eu posso prometer. Assim como prometo amar você até o final dos meus dias, incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o que tenho de mais precioso: a vida. Aquele que renovou minhas forças a cada manhã, capacitando-me para realizar e concluir mais essa etapa e que sempre me escuta em minhas orações diárias, me dando força e inspiração para viver. Obrigada, Senhor!

Agradeço aos meus pais, Severino Lins de Nogueira Filho e Lucivane Alves de Oliveira e ao meu irmão, Valter de Oliveira Nogueira, que mesmo pouco entendendo os meus rumos acadêmicos sempre estiveram presentes a me ajudar, em especial a minha mãe por ter me ensinado as verdadeiras bases e princípios da vida, contribuindo na minha formação pessoal, acadêmica e profissional. Pai e mãe, a vocês dedico todas as minhas conquistas, sei que essa é a alegria que posso proporcionar.

Ao meu sobrinho, Vagner Barros Nogueira, por todos os momentos de alegria. Trabalhar a semana inteira e encontra-lo nos finais de semana é bastante revigorante. Títia te ama!

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva por quem tenho profunda admiração, pela dedicação e participação em todas as etapas deste projeto. Agradecer também, por acreditar em mim, pelo apoio, estímulo, honestidade e pelo imenso e consistente exemplo como pesquisador e orientador. São mais de 8 anos de convivência, obrigada por toda a paciência durante a iniciação científica, o mestrado e o doutorado e por me ensinar a todo o momento. Trabalhar com você durante todos os anos foi um privilégio para mim. João, muito obrigada por tudo!

Ao meu amigo Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, pelo apoio, conselho e palavras de incentivo. A sua energia e sede de pesquisar é contagiante. Você e essa sua energia foram primordiais desde a iniciação científica e me fizeram chegar até aqui. Brito, você é o irmão que a vida acadêmica me deu. Obrigada por toda a ajuda de sempre.

Ao técnico/amigo do laboratório, Dr. Danilo Fontes, sempre disposto a nos ajudar. Ganhei um amigo o qual sou grata eternamente. Espero levar a nossa amizade iniciada no laboratório para o resto da vida.

A Monique Assis por todos os experimentos compartilhados, pelos momentos de descontração. Juntas aprendemos e crescemos muito. Obrigada por tanto me ouvir e pelas palavras incentivadoras. Nosso dia 1 vai chegar kkkk

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica! Em especial a Débora Santos, Luana D'Arc, Palloma Dornelas, Aline Siqueira, Laura Mota, Ially Fabiane, Ana Paula Arcoverde, Taís Helena e Reginaldo Filho.

A professora Carol Leandro a qual tenho profunda admiração. Quando crescer quero ser igual à senhora! Obrigada por ter me aceitado para trabalhar com atividade física voluntária materna. Foi uma experiência maravilhosa para mim! Obrigada também por todos os ensinamentos e pela paciência. Sou sua fã.

Ao amigo Diogo Vasconcelos, obrigada por todos os ensinamentos transmitidos e pela paciência para me ensinar biologia molecular!!!

Ao amigo David Filipe, obrigada por todos os momentos de descontração. Vamos lutar pela alegria do dia primeiro heheheh né isso?! Obrigada por dividir as preocupações e por deixar os nossos dias mais leve.

A secretaria do programa de Pós Graduação, Cecília e Andréa. Parabéns pela competência e agilidade dessa dupla. Sempre dispostas a nos atender e nos ajudar. Um forte abraço meninas.

Estendo os meus agradecimentos à coordenação do Programa de Pós Graduação em Nutrição, aos cuidados da Prof^a. Elizabeth Nascimento. Agradeço por conduzir tão bem o nosso programa. Que Deus continue lhe iluminando.

Ao CAV, pelo local em que pude desenvolver meus experimentos. Tenho imenso orgulho deste local. E me sinto na obrigação de contribuir para o crescimento deste centro. Foi nele onde tudo começou. Dia 04.08.2008 iniciava a minha vida acadêmica neste local. Amor imenso pelo local, pelos funcionários, pelos professores da graduação e pelas oportunidades.

A FIOCRUZ, em especial a pesquisadora Dra. Tatiany Pompílio por toda a atenção e ensinamentos que guardarei para sempre. Pude conhecer um pouquinho do mundo fantástico da biologia molecular. Inicialmente confesso que fiquei um pouco assustada, trabalhar com biologia molecular era tudo novo para mim. Agradeço a Deus por ter colocado-a em minha vida. Sou grata eternamente por todos os ensinamentos e por ter aberto as portas do seu laboratório para executarmos a nossa pesquisa.

Agradecer também a Elisama Helvécio por toda a paciência comigo rsrsrs sou grata a você eternamente.

Agradecer a pesquisadora de Milena Paiva pela atenção e ajuda na padronização da técnica.

Ao Núcleo de Plataforma Tecnológica do Aggeu Magalhães – FIOCRUZ PE por ter disponibilizado o espaço e equipamentos que me permitiram a realização dos experimentos com biologia molecular.

Aos animais que fizeram parte da minha pesquisa. Sinto-me sem palavras para falar sobre vocês aqui.

Ao veterinário do biotério do CAV, Vinícius Vasconcelos, ao professor responsável pelo biotério, Sebastião Rogério e a bioterista Juliete. Obrigada por sempre fazerem de tudo para manter os nossos animais nas melhores condições que estão ao nosso alcance. Sei dos esforços e empenho desse trio para dar a assistência aos nossos animais;

Ao meu esposo, Jamisson Souza. Seu valioso apoio foi definitivo em todos os momentos deste trabalho. Agradeço por todos os momentos de alegria, as palavras de conforto durante os momentos de ansiedade, lembro quando você fala: “Vai dar tudo certo!”.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para o bom andamento deste trabalho. Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

O presente estudo avalia se a atividade física materna atenua as disfunções cardiorrespiratórias e as alterações transcricionais apresentadas pelo corpo carotídeo (CB) de ratos de mães submetidas à restrição proteica. Avaliar se a atividade física materna é capaz de atenuar os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela desnutrição proteica. Ratas Wistar realizaram atividade física voluntária por um período de 30 dias e foram classificadas como inativas (n=12) ou ativas (n=12) de acordo com a distância percorrida diariamente no cicloergômetro. Logo depois, as ratas foram colocadas para acasalar. Durante a gestação e lactação, as mães receberam dieta normoproteica (NP: 17% de proteína, n=18) ou hipoproteica (LP: 8% de proteína, n=18). Na prole, avaliaram-se os níveis séricos bioquímicos (proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos e glicemia de jejum), respiratórios (frequência respiratória-FR; volume corrente-VT e ventilação-VE) e parâmetros cardiovasculares (pressão arterial média-PAM; frequência cardíaca-FC e variabilidade cardíaca) e expressão de mRNA do fator 1-alfa indutível por hipóxia (HIF-1 α), tirosina hidroxilase (TH) e receptores purinérgicos (P2X2, P2X3 e P2Y2) em ratos jovens. Os filhotes LP inativo apresentaram menores valores de FR do 1º ao 14º dia de idade, e maior FR aos 30 dias de idade do que os filhotes NP-inativo e NP-ativo. Os filhotes LP e LP-inativo apresentaram proteína sérica reduzida, albumina, colesterol e triglicérides e glicemia de jejum aumentada quando comparados aos grupos NP-inativo e NP-ativo. Animais LP e LP-inativo mostraram um aumento na variabilidade cardíaca nas bandas LF, sugerindo uma grande influência da atividade nervosa simpática. Nas análises de mRNA, os animais LP e LP-inativo apresentaram aumento de HIF-1 α e expressão similar de TH e receptores purinérgicos no corpo carotídeo (CB) quando comparados aos grupos NP. Todas essas alterações observadas nos filhotes LP-inativos foram atenuadas nos filhotes de mães ativas (grupo LP-ativo). A atividade física materna é capaz de atenuar as alterações metabólicas, cardiovasculares, respiratórias e de transcrição do HIF-1 α induzidas pela desnutrição proteica perinatal.

Palavras-chave: . Frequência respiratória. Pressão sanguínea. Ratos.

ABSTRACT

The present study evaluates whether maternal physical activity attenuates cardiorespiratory dysfunctions and transcriptional alterations presented by the carotid body (CB) of rats from mothers subjected to protein restriction. To evaluate whether maternal physical activity is able to attenuate the cardiorespiratory effects promoted by protein malnutrition. Female Wistar rats performed voluntary physical activity over a period of 30 days and were classified as inactive (n=12) or active (n=12) according to the distance walked daily on the running wheel. Soon after, the rats were placed to mate. During gestation and lactation, mothers received either normoprotein (NP: 17% protein, n=18) or low protein diet (LP: 8% protein, n=18). In offspring, it was evaluated biochemical serum levels (total protein, albumin, cholesterol, triglycerides and fasting glucose), respiratory (respiratory frequency, FR; tidal volume, VT; and ventilation, VE) and cardiovascular parameters (mean arterial blood pressure, MAP; heart rate, HR; and cardiac variabilities) and mRNA expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α), tyrosine hydroxylase (TH) and purinergic receptors (P2X2, P2X3 and P2Y2) in juvenile rats. LP-inactive pups presented lower RF from 1st to 14th days old, and higher RF at 30 days old than NP-inactive and NP-active pups. LP-inactive pups presented a reduced serum protein, albumin, cholesterol and triglycerides and increased fasting glucose when compared to the NP-inactive and NP-active groups. LP and LP-inactive animals showed an increase in the cardiac variability at the LF bands, suggesting a major influence of sympathetic nervous activity. In mRNA analyzes, LP-inactive animals showed increased HIF-1 α and similar expression of TH and purinergic receptors in carotid body (CB) when compared to the NP groups. All these changes observed in LP-inactive pups were rescued in the pups of active mothers (LP-active group). The maternal physical activity is able to attenuate the metabolic, cardiovascular, respiratory and HIF-1 α transcription changes induced by the perinatal protein malnutrition.

Keywords: Respiratory frequency. Blood pressure. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Visão lateral da gaiola de atividade física voluntária (A) e suas dimensões (B).....	39
Figura 2-	Gaiola de atividade física voluntária com cicloergômetro e comedouro (A) e cicloergômetro fora da gaiola de atividade física voluntária (B).	40
Figura 3-	Esquema do funcionamento do ciclocomputador com os sensores (Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan). Componentes do ciclocomputador (A). Posicionamento de um sensor na porção externa da GAFV, acoplado ao ciclocomputador (B). Visão interna dos sensores, um acoplado ao cicloergômetro e outro na GAFV (C). Rata realizando atividade física (D).....	40
Figura 4-	Esquema de formação dos grupos experimentais para as análises funcionais.....	42
Figura 5-	Esquema de formação dos grupos experimentais para as análises de biologia molecular.	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Consumo alimentar durante os períodos de adaptação, de gestação e de lactação. Durante os períodos de adaptação e gestação, os grupos foram constituídos por NP (n = 5), LP (n = 5), NP inativo (n = 5), NP-ativo (n = 5), LP inativo (n = 5). e LP-ativo (n = 5). Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * p <0,05 usando ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Bonferroni.....	49
Gráfico 2-	Ganho de massa corporal da prole no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida do grupo NP (n = 6), LP (n = 6), NP inativo (n = 6), NP-ativo (n = 6), LP inativo (n = 6). e LP-ativo (n = 6). Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * p <0,05 usando ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni.....	50
Gráfico 3-	Parâmetros cardíacos (A, pressão arterial média - PAM, B, pressão sistólica - PS, C, pressão diastólica - DP e D, frequência cardíaca - FC) de filhotes de ratos, aos 30 dias de vida. Os grupos foram constituídos por NP (n = 8), LP (n = 8), NP-inativo (n = 8), NP-ativo (n = 8), LP-inativo (n = 8) e LP-ativo (n = 8). Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * p <0,05 usando ANOVA two-way.....	52
Gráfico 4-	Variabilidade cardiovascular da pressão arterial sistólica (PAS). As bandas de baixa frequência - LF (A), bandas de alta frequência - HF (B), relação LF/HF (C), variabilidade não-linear da frequência cardíaca das sequências de 0V (D) e variabilidade não-linear da frequência cardíaca das sequências de 2V (E) de filhotes de ratos, com 30 dias de vida provenientes de mães submetidas a uma dieta de normoproteica (NP, 17% de proteína, n=8) ou hipoproteica (LP, 8% de proteína, n=8) durante a gestação e lactação. E de mães que realizavam atividade física voluntária (NP-inativo, n = 8, NP-ativo, n = 8, LP-inativo, n = 8 e LP-ativo, n = 8). Os valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M, p <0,05. * e #	

	Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ usando ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.....	53
Gráfico 5-	Parâmetros ventilatórios (frequência respiratória - FR, volume corrente - VT e ventilação pulmonar - VE) de descendentes de ratos, aos 1, 7, 14, 21 e 30 dias de idade. Os grupos foram constituídos por NP (n = 8), LP (n = 8), NP-inativo (n = 8), NP-ativo (n = 8), LP-inativo (n = 8) e LP-ativo (n = 8). A, C e E mostram os parâmetros ventilatórios de ratos que não tiveram atividade física (grupos NP e LP), B, D e F mostram os parâmetros inativo e ativo dos grupos. Os valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M. * Os valores médios foram significativamente diferentes daqueles do grupo NP ($p < 0,05$; teste de Student não pareado). # Os valores médios foram significativamente diferentes após a análise intragrupo (ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni).	55
Gráfico 6-	Expressão de HIF-1 α (A), P2X2 (B), P2X3 (C), P2Y2 (D) e TH (E) em CB de descendentes de ratos, com 30 dias de idade, de mães submetidas à dieta normoproteica (NP, 17% de proteína, n=5) ou hipoproteica (LP, 8% de proteína, n=5) durante a gravidez e lactação. E de mães que realizavam atividade física voluntária (NP-inativo, n=5, NP-ativo, n=5, LP-inativo, n=5 e LP-ativo, n= 5). Os valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M, $p < 0,05$. * Os valores médios foram significativamente diferentes após análise intragrupo (ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição das dietas.....	38
Tabela 2-	Classificação dos grupos experimentais de acordo com a atividade física diária (distância percorrida, gasto calórico e tempo de atividade) no cicloergômetro.....	41
Tabela 3-	Sequências de primers utilizados para análise de RT-PCR.....	48
Tabela 4-	Parâmetros bioquímicos séricos (proteína total, albumina, triglicerídeo, colesterol total e glicose em jejum) da prole de ratos com 22 dias de idade, de mães controles, inativas e ativas submetidas a uma dieta normo-proteica (NP, 17% de proteína, n = 8) ou baixa dieta protéica (LP, 8% de proteína, n=8) durante a gravidez e lactação	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN-93G	do inglês, American Institution of Nutrition- Dieta de crescimento
AIN-93M	do inglês, American Institution of Nutrition- Dieta de manutenção
ATP	Trifosfato de Adenosina
CB	do inglês, Carotid ody
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
e.p.m	Erro Padrão da Média
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
GAFV	Gaiola de Atividade Física Voluntária
H ⁺	Íons Hidrogênio
HF	do inglês, High Frequency
HIF-1 α	Fator-1 α indutível por Hipóxia
Hz	Hertz
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
KCN	Cianeto de Potássio
LF	do inglês, Low frequency
LP	Hipoproteica
mTOR	Alvo Mamífero da Rapamicina
NaCN	Cianeto de Sódio
NP	Normoproteica
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
P2X2	Receptores purinérgicos P2X2
P2X3	Receptores purinérgicos P2X3
P2Y	Receptores purinérgicos P2Y

PA	Pressão Arterial
PaCO ₂	Pressão Parcial Arterial de Dióxido de Carbono
PAM	Pressão Arterial Média
PaO ₂	Pressão Parcial Arterial de Oxigênio
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PD	Pressão Diastólica
pH	Potencial Hidrogeniônico
TH	Tirosina Hidroxilase
Tm	Temperatura de Melting
VE	Ventilação Pulmonar
VT	do inglês, Tidal Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
®	Marca registrada
μ	Micro (10^{-6})
°	Grau
α	Letra do alfabeto grego - alfa
Δ	Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	MODELOS NUTRICIONAIS E O ESTUDO DA DESNUTRIÇÃO.....	23
2.2	EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	24
2.3	ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E QUIMIORREFLEXO.....	26
2.4	NEUROTRANSMISSÃO NO CORPO CAROTÍDEO E EXPRESSÃO GÊNICA.....	30
2.5	ATIVIDADE FÍSICA MATERNA.....	33
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVO	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5	MÉTODOS	37
5.1	ANIMAIS E DIETAS EXPERIMENTAIS.....	37
5.2	GAIOLA DE ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA.....	39
5.3	PROTOCOLO DE ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA.....	41
5.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	41
5.5	ACOMPANHAMENTOS DE INGESTÃO ALIMENTAR DAS MÃES.....	43
5.6	ACOMPANHAMENTOS DO GANHO DE MASSA CORPORAL DA PROLE.....	43
5.7	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO DA PROLE.....	43
5.8	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	44
5.9	ANÁLISE DA VARIABILIDADE.....	45
5.10	MEDIDAS DA VENTILAÇÃO PULMONAR.....	45
5.11	PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
5.12	EXTRAÇÃO DE MRNA.....	46
5.13	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR	

	QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR).....	47
5.14	ANÁLISES DOS DADOS.....	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	INGESTÃO DE ALIMENTO DAS MÃES DURANTE O PERÍODO DE ADAPTAÇÃO, GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	49
6.2	GANHO DE MASSA CORPORAL DA PROLE.....	49
6.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO DA PROLE.....	50
6.4	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	51
6.5	MEDIDAS DA VENTILAÇÃO PULMONAR.....	54
6.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	56
7	DISCUSSÃO.....	58
8	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE A - ARTIGO 1 - MATERNAL PHYSICAL ACTIVITY PREVENTS THE OVEREXPRESSION OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1-A AND CARDIORESPIRATORY DYSFUNCTION IN PROTEIN MALNOURISHED RATS.....	78
	APÊNDICE B - ARTIGO 2 - CAROTID BODY REMOVAL NORMALIZES ARTERIAL BLOOD PRESSURE AND RESPIRATORY FREQUENCY IN OFFSPRING OF PROTEIN- RESTRICTED MOTHERS.....	110
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	124

1 INTRODUÇÃO

Evidências epidemiológicas e dados experimentais têm observado a importância da nutrição materna durante a gestação e a lactação no aparecimento da hipertensão arterial (DE BRITO ALVES, DE OLIVEIRA et al., 2016; HROLFSDOTTIR, HALLDORSSON et al., 2017; LORITE MINGOT, GESTEIRO et al., 2017). Em humanos, a desnutrição materna em períodos críticos do desenvolvimento – o que corresponde a gestação e lactação – é capaz de promover alterações cardíacas, como a hipertensão arterial (ZHENG, WANG et al., 2012; BARKER and THORNBURG 2013; LIU, XU et al., 2017). Em ratos, tem sido proposto que a prole adulta proveniente de mães submetidas à redução no teor proteico da dieta (8% de proteína), durante a gestação e lactação, desenvolve hipertensão arterial e desequilíbrio simpato-vagal para o coração (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014; BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015). Além dessas alterações, a prole desnutrida apresenta aumento de frequência respiratória e maior resposta ventilatória quando submetido a hipóxia (redução nos níveis de O₂) e a hipercapnia (aumento nos níveis de CO₂) antes do desenvolvimento da hipertensão arterial (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014).

Em animais, uma revisão recente mostrou evidências de que a hipertensão arterial pode ter uma origem desenvolvimental e as disfunções simpático-respiratórias desempenham um papel importante no desenvolvimento da hipertensão induzida pela dieta materna (COSTA-SILVA, DE BRITO-ALVES et al., 2015; DE BRITO ALVES and COSTA-SILVA 2018). Estudo *in situ* com ratos jovens (30 dias de vida) submetidos à restrição proteica materna (8% de proteína) evidenciou hiperatividade simpático-respiratória quando avaliado a atividade do nervo frênico e a atividade nervosa simpática (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). Seguindo a observação de que a hiperatividade simpática está relacionada ao desenvolvimento de hipertensão em organismos que sofreram desnutrição proteica durante a gestação e lactação. Mudanças funcionais nas células do corpo carotídeo (CB) induzidas pela disponibilidade de nutrientes/oxigênio foram descritas nos últimos anos e podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da hipertensão arterial (PRABHAKAR, PENG et al., 2015).

Alteração proteica foi encontrada no CB de ratos jovens (30 dias de vida), provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica (DE BRITO ALVES,

NOGUEIRA et al., 2015). Ao ser avaliado o CB dos ratos jovens desnutridos, foi possível observar aumento da expressão do fator 1-alfa indutível por hipóxia, também conhecido como HIF-1 α (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). O aumento da expressão de HIF-1 α foi observado anteriormente no coração e no cérebro de animais com restrição proteica, os quais também apresentaram hipertensão arterial (ITO, TANABE et al., 2011; ITO, FUNAMOTO et al., 2012). Além disso, a remoção do CB atenuou as disfunções cardiorrespiratórias encontradas em ratos desnutridos, normalizando a frequência respiratória e a quimiossensibilidade ao O₂ e ao CO₂ e impediu o desenvolvimento da hipertensão arterial (NOGUEIRA, BRITO-ALVES et al., 2018). Sugerindo que o CB de ratos desnutridos apresentam uma maior excitabilidade, a qual pode contribuir para o aumento da frequência respiratória e da quimiossensibilidade ao O₂ e CO₂.

Na tentativa de desvendar a causa dessa maior excitabilidade é reconhecido que uma multiplicidade de mecanismos rege a sinalização do CB (PRABHAKAR and PEERS 2014; SCHULTZ, MARCUS et al., 2015; YUAN, VASAVDA et al., 2015). Dentre elas destacam-se os canais iônicos para a adenosina trifosfato (ATP) (chamados de receptores purinérgicos – P2X), especificamente os subtipos de receptores P2X2, P2X3 e P2Y localizados no CB (FORD and UNDEM 2013; ABDULQAWI, DOCKRY et al., 2015; FORD, UNDEM et al., 2015) e a expressão da tirosina hidroxilase (TH). Os receptores purinérgicos contribuem para o aumento da atividade do CB e seu bloqueio pode induzir um efeito anti-hipertensivo (PIJACKA, MORAES et al., 2016). O CB e as fibras nervosas sensitivas e autonômicas expressam TH, a enzima limitadora da velocidade da síntese de dopamina (WANG, STENSAAS et al., 1992; LAHIRI, ROY et al., 2006). A liberação da dopamina é frequentemente usada como indicador da neurosecreção promovendo um aumento da atividade do CB (GONZALEZ, ALMARAZ et al., 1994; URENA, FERNANDEZ-CHACON et al., 1994).

Intervenções específicas de "reprogramação", como atividade física, podem diminuir ou até mesmo prevenir o desenvolvimento de doenças metabólicas induzidas pela desnutrição proteica materna (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013). A prática da atividade física é uma das recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e é considerado uma intervenção amplamente acessível, barata e eficaz (LOPEZ-OLMEDO, HERNANDEZ-CORDERO et al., 2016). Uma meta-análise incluiu 13 estudos

prospectivos e mostrou uma associação dose-resposta inversa entre os níveis de atividade física e o risco de hipertensão (HUI, XUN et al., 2013). Modelo experimental de atividade física materna foi desenvolvido com o intuito de descrever as adaptações fisiológicas para a mãe e a prole (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014; FRAGOSO, LIRA et al., 2017). A atividade física voluntária da mãe (na roda de corrida, 30 dias antes do acasalamento e durante a gestação/lactação) tem sido relacionada ao aumento do crescimento somático e à ontogênese reflexa da prole de ratos durante o desenvolvimento (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014). Além disso, a atividade física voluntária antes e durante a gestação/lactação na roda de corrida atenuou os efeitos da dieta materna pobre em proteínas (8% de proteína) nos padrões de atividade locomotora dos ratos aos 60 dias de idade (FRAGOSO, LIRA et al., 2017). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da atividade física materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e os efeitos adaptativos para atenuar a hipertensão induzida pela desnutrição nos filhos.

No presente estudo, testamos a hipótese de que a atividade física voluntária materna antes e durante a gestação é capaz de atenuar as alterações simpato-respiratórias induzidas pela desnutrição proteica materna. Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da atividade física voluntária da mãe sobre alguns parâmetros dos sistemas cardiorrespiratório e simpático. Além disso, descreveram-se as alterações transcricionais de HIF-1 α , TH e P2X no CB como possíveis mecanismos moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODELOS NUTRICIONAIS E O ESTUDO DA DESNUTRIÇÃO

Evidências epidemiológicas sugerem uma forte associação entre a desnutrição em períodos críticos de desenvolvimento fetal, como a gestação e lactação, o baixo peso ao nascer e o subsequente risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doenças metabólicas (DAUNCEY and BICKNELL 1999; TARRY-ADKINS and OZANNE 2011; VAAG, GRUNNET et al., 2012). Modelos animais, com roedores, suínos, ovinos e primatas (VAN ABELEN, VEENENDAAL et al., 2012), são amplamente utilizados para investigar os efeitos da nutrição materna e o desenvolvimento de doenças na prole. Esses modelos têm promovido um avanço importante no estudo da desnutrição. A utilização desses modelos torna possível realizar manipulações dietéticas controladas *in utero* e durante o período pós-natal, o que seria praticamente inviável em humanos. Além de permitir a utilização de diferentes protocolos de desnutrição, possuir fácil manejo e baixo custo.

Vários modelos de desnutrição são utilizados com o intuito de investigar o papel nutricional sobre a fisiologia de órgãos e sistemas. Alguns autores adotam como modelo o aumento no número de filhotes da ninhada durante o período de aleitamento, levando à competição pelo leite materno e, conseqüentemente diminuição da disponibilidade de nutrientes para cada animal individualmente (CHASE, DORSEY et al., 1967; BELL and SLOTKIN 1988). Outro modelo utilizado constitui na deficiência de vitaminas sobre parâmetros fisiológicos, como por exemplo, a deficiência da vitamina A (MCGOWAN, TAKLE et al., 2005; BAYBUTT and MOLTENI 2007; MCGOWAN 2007) e da vitamina E (TOLLE, SCHLAME et al., 2005; YAMAOKA, KIM et al., 2008) sobre o sistema respiratório, ou até mesmo a redução da quantidade de calorias ingeridas levando os animais a um quadro de desnutrição (REHAN, SAKURAI et al., 2012). Também tem sido utilizado um modelo de desnutrição que se refere à diminuição do conteúdo proteico oferecido à fêmea no período de gestação (TONKISS, TRZCINSKA et al., 1998), lactação (PEDROSA and MORAES-SANTOS 1987) ou pós lactação (AGARWAL, PRASAD et al., 1981; BENABE, WANG et al., 1993). Ou ainda, a indução de uma desnutrição proteica

durante a gestação e a lactação, denominado como período perinatal (SNOECK, REMACLE et al., 1990).

Este último modelo consiste em alimentar um grupo de fêmeas, durante toda a gestação e lactação, com uma dieta contendo um reduzido teor de proteína (grupo denominado de hipoproteico - 8% de proteína) e uma dieta com quantidades adequadas de proteínas (grupo denominado de normoproteico – 17 a 21% de proteína). Permitindo investigar as repercussões da carência de proteínas durante o período de desenvolvimento e o estado de saúde ou doença da prole (MARTIN-GRONERT and OZANNE 2007; DE MELO MONTENEGRO, MOITA et al., 2012; FALCAO-TEBAS, BENTO-SANTOS et al., 2012). Todos estes modelos permitem o estudo dos efeitos da desnutrição.

2.2 EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

A hipertensão arterial é caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PAULINO-SILVA and COSTA-SILVA 2016). Consiste um fator de risco prevalente e significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (LANDSBERG, ARONNE et al., 2013; COSTA-SILVA, DE BRITO-ALVES et al., 2015; WILLIAMS 2016). A causa subjacente da hipertensão tem sido difícil de identificar devido à natureza multifatorial, destacando-se como principais causas a deterioração progressiva dos néfrons (NWAGWU, COOK et al., 2000), aumento da resistência vascular periférica (SZOSTAK-WEGIEREK 2014), aumento da frequência respiratória (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014), maior excitabilidade das células do CB (NOGUEIRA, BRITO-ALVES et al., 2018) e hiperatividade do sistema nervoso simpático (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015), dentre outras causas.

A hipertensão pode surgir de uma combinação de fatores genéticos e comportamentais relacionados ao estilo de vida (BARKER, WINTER et al., 1989; BARKER 2007). Além disso, parece haver uma forte relação entre as condições do ambiente fetal e o pós-natal precoce com predisposição ao desenvolvimento da hipertensão arterial (BARKER, WINTER et al., 1989; BARKER 2007). Quando o ambiente fetal é carente de nutrientes, o feto passa por um processo no qual há um

efeito protetor contra o desenvolvimento de alguns órgãos (por exemplo: cérebro, coração), mas em contraste ocorrem mudanças metabólicas que podem refletir em estágios mais avançados da vida (BARKER, WINTER et al., 1989; BARKER 2007). Estudos em humanos demonstraram que indivíduos com baixo peso ao nascer apresentam uma forte tendência à hipertensão na idade adulta (FRANCO, CASARINI et al., 2008; JONES, JURGENS et al., 2012). Isso pode ser explicado pelo aumento considerável das catecolaminas plasmáticas e pela insuficiência uteroplacentária resultante da desnutrição perinatal, possíveis mecanismos subjacentes ao início da hipertensão arterial (FRANCO, CASARINI et al., 2008; JONES, JURGENS et al., 2012).

Bogdarina e cols (2007) observaram uma diminuição da metilação na região promotora proximal do receptor de angiotensina e, inversamente, um aumento na expressão do receptor angiotensinérgico na glândula adrenal de mães de camundongos que sofreram desnutrição protéica durante a gravidez (BOGDARINA, WELHAM et al., 2007). Outro estudo encontrou um aumento na expressão do RNAm do angiotensinogênio, bem como na enzima conversora da angiotensina, e uma diminuição na expressão do RNAm do receptor da angiotensina II na restrição da proteína perinatal exposta à prole de ratos (GOYAL, GOYAL et al., 2010). Tais alterações epigenéticas são importantes na compreensão dos mecanismos subjacentes ao surgimento da hipertensão em modelos experimentais de desnutrição protéica no contexto da plasticidade fenotípica (BARKER, OSMOND et al., 2005; WEST-EBERHARD 2005; LABAYEN, MORENO et al., 2006; ANDERSEN, ANGQUIST et al., 2009; BIOSCA, RODRIGUEZ et al., 2011; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014). Os mecanismos presentes no surgimento de tais alterações funcionais de insultos nutricionais durante a gestação e lactação ainda não são totalmente compreendidos, mas podem estar associados a uma "programação" dada pela plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD 2005; WILLIAMS 2016).

O modelo de restrição proteica na dieta materna durante a gestação e/ou lactação é um dos modelos animais mais estudados para investigar os efeitos da plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD 2005; COSTA-SILVA, SILVA et al., 2009; FALCAO-TEBAS, BENTO-SANTOS et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014). Estudos demonstraram que o consumo de uma dieta pobre em proteínas (8% de proteína) durante a

gestação e a lactação, seguido de um consumo alimentar balanceado pode levar a restrição do crescimento somático, redução de peso e maturação dos órgãos, aumento da pressão arterial sistólica e da concentração de insulina plasmática em jejum (BERARDI, PIZZORUSSO et al., 2003; ANDERSEN, ANGQUIST et al., 2009; LUZARDO, SILVA et al., 2011).

Sabe-se que a ritmicidade do sistema nervoso simpático pode modular a pressão arterial e a frequência cardíaca em frequências regulares (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015). A hiperativação simpática é caracterizada pelo aumento da intensidade e frequência da despolarização elétrica do nervo simpático e também pelo aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (MALPAS 1998; ZOCCAL, SIMMS et al., 2008) promovendo constrição dos vasos sanguíneos periféricos, aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, aumento em níveis pressóricos basais arteriais. Recentemente, foi demonstrado que ratos adultos que sofreram desnutrição proteica têm, principalmente, um desequilíbrio simpático-vagal ao coração e aumento da variabilidade da pressão arterial com o aumento da banda de baixa frequência (LF), sugerindo desequilíbrio autonômico e predominância simpática no sistema cardiovascular desses animais (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015).

2.3 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E QUIMIORREFLEXO

Outros estudos também propuseram a contribuição da disfunção simpatoexcitatória respiratória no desenvolvimento da hipertensão induzida pela dieta materna (PAIXAO, MACIEL et al., 2001; CARROLL 2003; BOGDARINA, WELHAM et al., 2007; BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). Além disso, sugere-se que mudanças na geração ou modulação da função respiratória possam contribuir para o estabelecimento da pressão arterial elevada (PAIXAO, MACIEL et al., 2001; BOGDARINA, WELHAM et al., 2007). Ratos submetidos à restrição proteica na dieta durante a gestação e lactação apresentaram disfunção respiratória associada à hiperatividade simpática e aumento da sensibilidade do corpo carotídeo à hipóxia (HANSON and GLUCKMAN 2011; PRABHAKAR and SEMENZA 2015). O mecanismo por trás dessas mudanças pode estar relacionado a altos níveis do fator 1-alfa indutível por hipóxia (HIF-1 α) em

quimiorreceptores periféricos de ratos desnutridos (ITO, AHMAD et al., 2011; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que animais jovens (30 dias de idade), de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal, apresentam alterações no padrão respiratório basal e seu controle reflexo, mesmo antes de desenvolverem hipertensão arterial (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). Além disso, sugere-se que tais alterações ventilatórias em animais levem ao quadro de hiperatividade simpática desde os 30 dias de idade que persiste na idade adulta da prole (HANSON and GLUCKMAN 2011; LUZARDO, SILVA et al., 2011; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). Assim, acredita-se que a plasticidade atue promovendo as alterações ventilatórias e induzindo uma hiperatividade do sistema nervoso simpático, o que deve contribuir para o desenvolvimento da hipertensão neste modelo experimental (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015).

Simms e cols. (2009) demonstraram que modificações respiratórias, especialmente, aumento na quimiossensibilidade ao CO₂, estão envolvidos com a hiperatividade do sistema nervoso simpático e o aparecimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SIMMS, PATON et al., 2009). Além disso, a prole adulta de ratos submetidos a desnutrição proteica apresenta hipertensão arterial (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014) e desequilíbrio simpato-vagal para o coração (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015), demonstrando aumento da atividade nervosa simpática. Quando jovens (30 dias de vida) esses animais apresentam aumento de frequência respiratória (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014), maior quimiossensibilidade ao O₂ e CO₂ (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014), aumento na atividade do nervo frênico e simpático torácico (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015) e maior excitabilidade nas células do CB (NOGUEIRA, BRITO-ALVES et al., 2018). Sugere-se que essas alterações contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial neste modelo experimental.

Em ratos desnutridos (30 dias de vida), a remoção dos quimiorreceptores periféricos (CB) é capaz de normalizar a frequência respiratória e prevenir o desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta dos animais, aos 90 dias de vida (NOGUEIRA, BRITO-ALVES et al., 2018). Demonstrando que as células do CB geram sinalizações que contribuem para o aumento do tônus simpático e da

frequência respiratória, e que estão anormalmente ativadas em indivíduos hipertensos (MORAES, MACHADO et al., 2015). Podendo a remoção do CB ser considerada como alvo terapêutico para hipertensão e doenças associadas.

Os CB estão localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida. Funcionam como sensores que alertam o sistema nervoso central, quando, por algum motivo, o nível de O_2 no sangue diminui (HEYMANS 1927). Quando esse sinal de alerta chega ao cérebro, é desencadeada uma resposta de aumento da atividade simpática, que faz aumentar a frequência cardíaca e a resistência vascular à passagem do fluxo sanguíneo, causando aumento da pressão arterial. Ocorre também o aumento da respiração para aumentar o aporte de oxigênio para o cérebro (BARROS, BONAGAMBA et al., 2002; MORAES, MACHADO et al., 2015).

Heymans e cols. (1965) evidenciaram o papel fisiológico do CB no controle circulatório e respiratório, evidenciando o papel dessa estrutura em diversas condições, como a hipóxia e hipercapnia, por exemplo. Esses autores mostraram que a perfusão da região do seio carotídeo com sangue hipercapnêico, hipóxico ou com alta concentração de íons H^+ induzia variações sobre o sistema cardiovascular e respiratório por um mecanismo reflexo envolvendo receptores do CB (HEYMANS 1965; PRABHAKAR 2013). Estudos morfológicos de Pallot (1987) sugeriram que os CB são estruturas especializadas formadas por dois tipos celulares distintos: células do tipo I (as chamadas células glomus) que encontram-se envolvidas pelas células do tipo II ou de sustentação (semelhante a astrócito) (HOWE, MORGAN et al., 1978; PALLOT 1987). Quando a disponibilidade de O_2 encontra-se diminuída ou há um acúmulo de CO_2 e de íons H^+ , os CB são estimulados. As quedas na pressão parcial de oxigênio (PaO_2) e pH e/ou elevação na pressão parcial de dióxido de carbono ($PaCO_2$) são transformados pelos CB, nas células glomais, em sinais elétricos. Os CB estimulam primeiramente os centros respiratórios, determinando alterações apropriadas da ventilação (frequência respiratória e volume corrente), mas também estimulam centros cardiovasculares, determinando alterações na pressão arterial (DALYMDE, HAZZLEDINE et al., 1965; DALY and UNGAR 1966; DALY, ANGELL-JAMES et al., 1979; GUYTON 1992)).

Estudos prévios demonstram que a infusão intravenosa de cianeto de sódio (NaCN) ou cianeto de potássio (KCN) estimulam os quimiorreceptores periféricos e promovem reflexamente ajustes respiratórios, como aumento de frequência respiratória e ajustes cardiovasculares como vasoconstrição periférica e aumento de

pressão arterial (FRANCHINI and KRIEGER 1993). Estas respostas ocorrem para tentar manter a homeostase do organismo. Esse é um sistema de defesa necessário, por exemplo, durante um episódio de apneia obstrutiva do sono. A queda na oxigenação causa a ativação das células do CB, que enviam o sinal de alerta para o cérebro. Em condições fisiológicas, após a normalização do nível de oxigênio do sangue, a atividade simpática volta ao normal, bem como a pressão arterial. Mas em experimentos com ratos hipertensos essas células ficam constantemente mandando sinais para o cérebro aumentar a atividade simpática. Além disso, a desnervação carotídea, na maioria das vezes, é uma maneira eficaz de controlar tanto o desenvolvimento quanto a manutenção da pressão sanguínea em modelos de ratos espontaneamente hipertensos (ABDALA, MCBRYDE et al., 2012; MCBRYDE, ABDALA et al., 2013) e em modelos de hipertensão induzida por desnutrição proteica materna (NOGUEIRA, BRITO-ALVES et al., 2018). Demonstrando que o CB gera uma atividade excitatória e é uma das causas para a hipertensão arterial (TAN, LU et al., 2010; PATON, SOBOTKA et al., 2013).

Estudos relatam que ao inibir a atividade do CB usando hiperóxia ou realizando secção do nervo carotídeo com o sistema nervoso central a pressão arterial e a atividade simpática é reduzida em ratos espontaneamente hipertensos (TAN, LU et al., 2010). Em hipertensos humanos, a hiperóxia diminui a atividade simpática e a secção do corpo carotídeo pode reduzir a pressão arterial (NAKAYAMA 1961). Esses estudos demonstram que a atividade do CB contribui para a hipertensão arterial. Por meio de um registro da atividade neural, as células do CB dos animais hipertensos estão continuamente mais ativadas que as dos animais controle. Além disso, quando os animais são submetidos a uma situação de redução de oxigênio, as células dos hipertensos respondem de forma mais exacerbada (MORAES, MACHADO et al., 2015). Embora a base mecanicista do aumento da atividade do CB seja pouco conhecido. A qual pode ser fundamental para refinar novas abordagens farmacológicas anti-hipertensivas.

Estudos que utilizaram a técnica de imunohistoquímica para a marcação da expressão da proteína c-Fos, um indicativo do nível de atividade neuronal, sugeriram que a primeira sinapse das aferências dos quimiorreceptores carotídeos ocorrem no Núcleo do Trato Solitário (NTS) e que após essa sinapse as informações são processadas e distribuídas para outros núcleos bulbares e pontinhos. O NTS é subdividido didaticamente em subnúcleos responsáveis pelo controle

cardiopulmonar, controle barorreflexo e controle gastrointestinal e é também responsável pelas aferências respiratórias (JORDAN and SPYER 1977; PALKOVITS and ZABORSZKY 1977; LOEWY and BURTON 1978; ERICKSON and MILLHORN 1991; MCKITRICK, KRUKOFF et al., 1992).

Estudos prévios de Franchini e Krieger (1993) mostraram em ratos que após a remoção do corpúsculo carotídeo as respostas cardiovasculares, respiratórias e comportamentais, induzidas por injeção intravenosa de KCN são abolidas. Interessantemente, outros estudos prévios relatam que após a remoção dos quimiorreceptores carotídeos, observa-se que os animais apresentam uma diminuição dos níveis pressóricos (~10 mmHg), porém, essa queda não é significativa, mesmo assim, os autores sugeriram que os quimiorreceptores carotídeos têm um papel tônico excitatório sobre o controle da PA (FRANCHINI and KRIEGER 1993). Entretanto, alguns estudos têm sugerido que a função cardiorrespiratória dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos diferem de acordo com a espécie analisada. Estudos com ratos têm evidenciado que os quimiorreceptores aórticos são ausentes (EASTON and HOWE 1983). Por outro lado, estudos com cães e gatos têm sugerido que os quimiorreceptores, tanto carotídeos quanto aórticos, desempenham um importante papel no controle da função cardiorrespiratória (COMROE 1939; DALY and UNGAR 1966; MARSHALL 1994). Para evidenciar ainda mais o papel dos quimiorreceptores periféricos, Lugliani (1973) observaram que em indivíduos apresentando comprometimento dos corpúsculos carotídeos, as respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia estavam prejudicadas, sugerindo que na espécie humana os quimiorreceptores carotídeos são essenciais para expressão do quimiorreflexo (LUGLIANI, WHIPP et al., 1973). Estudos em várias espécies animais têm demonstrado que na hipertensão arterial crônica os quimiorreceptores periféricos, especialmente os carotídeos, apresentam alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais, as quais poderiam estar correlacionadas com a gênese da hipertensão arterial (FRANCHINI and KRIEGER 1993).

2.4 NEUROTRANSMISSÃO NO CORPO CAROTÍDEO E EXPRESSÃO GÊNICA

Na tentativa de desvendar a causa dessa maior excitabilidade é reconhecido que uma multiplicidade de mecanismos rege a sinalização do corpo carotídeo

(PRABHAKAR and PEERS 2014; SCHULTZ, MARCUS et al., 2015; YUAN, VASAVDA et al., 2015). Dentre elas destacam-se os canais iônicos para o ATP (chamados de receptores purinérgicos – P2X), especificamente os subtipos de receptores P2X3 localizados no CB (FORD and UNDEM 2013; ABDULQAWI, DOCKRY et al., 2015; FORD, UNDEM et al., 2015). O ATP é um dos vários transmissores envolvidos no processo de transdução de hipóxia no corpo carotídeo (ZAPATA 2007). A expressão de receptores está presente no CB e em neurônios dos gânglios petrosais de ratos normotensos (PRASAD, FEARON et al., 2001). Em animais hipertensos além dos receptores para ATP estarem mais expressos, também respondem exageradamente quando o ATP é aplicado no local. Além disso, a deleção da subunidade P2X2 e P2X3 combinada reduziu a resposta ventilatória à hipóxia em camundongos (RONG, GOURINE et al., 2003). Sugerindo que os receptores P2X3 contribuem para o aumento da atividade do CB e o seu bloqueio pode prever um efeito anti-hipertensivo.

O ATP também pode ativar os receptores P2Y2 nas células vizinhas do tipo II, levando a um aumento do Ca^{2+} intracelular e à abertura dos canais da panexina-1. Quando abertos, os canais de panexina-1 causam liberação adicional de ATP, aumentando assim o sinal excitatório. A via eferente inibitória também pode ser ativada pelo ATP atuando em uma variedade de receptores P2X. A estimulação desses receptores P2X leva à síntese e liberação de óxido nítrico (NO), que por sua vez hiperpolariza as células do tipo I. A decomposição do ATP extracelular pela ecto-5'-nucleotidase gera adenosina, que também pode ser transportada diretamente das células do tipo I. A adenosina pode aumentar ainda mais as vias excitatórias no CB por meio de receptores A2a e A2b pré-sinápticos em células do tipo I e receptores A2a pós-sinápticos em terminais aferentes (ZHANG, PISKURIC et al., 2012; NURSE 2014; PISKURIC, ZHANG et al., 2014)

Além dos receptores purinérgicos a neurotransmissão adrenérgica possui um papel importante na modulação da atividade do CB. A dopamina é o neurotransmissor mais abundante nas células tipo I, e a sua liberação é frequentemente usada como indicador da neurosecreção promovendo um aumento da atividade do CB (GONZALEZ, ALMARAZ et al., 1994; URENA, FERNANDEZ-CHACON et al., 1994). O corpo carotídeo e as fibras nervosas sensitivas e autonômicas expressam tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitadora da velocidade da síntese de dopamina (WANG, STENSAAS et al., 1992; LAHIRI, ROY et al.,

2006). Alguns autores consideraram a dopamina como tendo um efeito inibitório, dado que estímulos naturais como a hipóxia ou a acidose estão associados a um aumento da secreção de dopamina. A dopamina é um neurotransmissor capaz de inibir a atividade do corpúsculo carotídeo (FIDONE and GONZALEZ 1982; SHAW, MONTAGUE et al., 1989; RIGUAL, LOPEZ-LOPEZ et al., 1991).

Recentemente, alguns estudos têm indicado uma relação entre as alterações na prole induzidas pela desnutrição materna e mudanças na expressão de fatores de transcrição, como HIF-1 α (HUANG, HICKEY et al., 2004; MALOYAN, ELI-BERCHOER et al., 2005; ITO, FUNAMOTO et al., 2012; LIM, KIRIAKIDIS et al., 2013; DE BRITO ALVES 2014). Brito Alves, 2015 evidenciou que a prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica apresenta um aumento da expressão proteica de HIF-1 α no corpúsculo carotídeo.

O HIF-1 α , possui um papel essencial na resposta celular a hipóxia, porém em normóxia o aumento da expressão dos níveis de HIF-1 α durante o início da vida está associado com o risco exacerbado de desenvolvimento de hipertensão (LEE, WOLF et al., 2000; ITO, FUNAMOTO et al., 2012). Neste sentido, tem sido relatado que fetos provenientes de mães que receberam durante a gestação uma dieta carente em proteínas, apresentam elevados índices nos níveis de HIF-1 α no cérebro e coração e sugere-se que estas alterações estejam relacionadas com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, como a hipertensão arterial (LEE, WOLF et al., 2000; ITO, TANABE et al., 2011; ITO, FUNAMOTO et al., 2012; LIM, KIRIAKIDIS et al., 2013). Além disso, tem sido relatado que o aumento na expressão de HIF-1 α promove uma diminuição de alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (MAJUMDER, FEBBO et al., 2004).

O mTOR é uma proteína envolvida na sinalização celular e possui um papel importante na regulação de crescimento, proliferação, motilidade e sobrevivência celular, bem como na síntese de proteínas, transcrição e sensibilidade ao nível energético celular. É um indicativo de que há energia disponível no corpo, funciona como um detector de sinais nutricionais/energéticos e age como um importante integrador de sinais indutores de fator de crescimento, agindo como sinalizador do metabolismo e destino celular (HAY and SONENBERG 2004; BEEVERS, LI et al., 2006; WULLSCHLEGER, LOEWITH et al., 2006). Níveis reduzidos de mTOR pode indicar que a célula está com um déficit nutricional, o que pode levar a um aumento na expressão de HIF-1 α .

2.5 ATIVIDADE FÍSICA MATERNA

É evidente que os fatores nutricionais e os hábitos de vida têm um papel importante sobre o estabelecimento do fenótipo dos indivíduos e, certamente, através de mecanismos epigenéticos, contribuem para a formação de órgãos e sistemas, bem como para o estabelecimento da saúde e da doença (WELLS 2010). Recentemente, muitos estudos têm relatado os benefícios da prática de atividade física durante a gestação sobre a formação e maturação dos órgãos e sistemas, atuando como fator promotor de saúde e diminuindo o aparecimento de doenças nos fetos (WOLFE and WEISSGERBER 2003; CLAPP 2008). Alguns modelos experimentais de atividade física materna têm sido utilizados para compreensão de como o organismo materno se adapta e como o feto estabelece estratégias de crescimento e desenvolvimento (FALCAO-TEBAS, BENTO-SANTOS et al., 2012).

A prática de exercício físico materno durante a gravidez é caracterizada por causar uma redução aguda nos níveis de oxigênio, ocasionada devido uma ligeira diminuição do fluxo sanguíneo para a placenta e uma subsequente redução da liberação de nutrientes para a placenta (CLAPP 2003). Por outro lado, nas horas subsequentes à prática do exercício há um aumento do volume plasmático e do débito cardíaco e essas mudanças ocorrem com o intuito de tamponar as reduções agudas de oxigênio e nutriente para a placenta.

Intervenções específicas de “reprogramação” como atividade física, podem mitigar ou até mesmo prevenir doenças metabólicas programadas por restrição proteica materna (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013). O aumento da atividade física é uma das recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e é considerado uma intervenção amplamente acessível, barata e eficaz (LOPEZ-OLMEDO, HERNANDEZ-CORDERO et al., 2016). Uma metanálise incluiu 13 estudos prospectivos e mostrou uma associação dose-resposta inversa entre os níveis de atividade física e o risco de hipertensão. (HUAL, XUN et al., 2013). O exercício materno reduz a pressão arterial, a resistência vascular sistêmica, a atividade simpática, a atividade da renina plasmática, o índice de resistência à insulina, o ganho excessivo de peso corporal e a circunferência abdominal e os lipídios sanguíneos (CORNELISSEN and FAGARD 2005; FERRARI and GRAF 2017; MAGRO-MALOSSO, SACCONI et al., 2017; WANG, WEI et al.,

2017). Mulheres grávidas saudáveis, sem contraindicações médicas, devem ser encorajadas a participar de atividades físicas regulares pelo menos 150 minutos por semana (de forma analógica, 20 a 30 minutos por dia, na maioria ou todos os dias da semana) em intensidade aeróbica moderada (FERRARI and GRAF 2017).

Modelo experimental de atividade física materna foi desenvolvido com o objetivo de descrever adaptações fisiológicas para a mãe e a prole (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014; FRAGOSO, LIRA et al., 2017). Filhotes de ratos ativos antes e durante a gestação (30min/dia, 5 dias/semana, 4 semanas) mostraram melhora na memória de longo prazo na tarefa de reconhecimento de objetos (MARCELINO, DE LEMOS RODRIGUES et al., 2016). A atividade física voluntária da mãe (roda de corrida, 30 dias antes da criação e durante a gestação/lactação) tem sido relacionada ao aumento do crescimento somático e à ontogênese reflexa da prole de ratos durante o desenvolvimento (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014). Atividade física voluntária antes e durante a gestação/lactação em roda de corrida atenuou os efeitos da dieta materna pobre em proteínas (8% de proteína) sobre os padrões de atividade locomotora de ratas aos 60 dias de idade (FRAGOSO, LIRA et al., 2017). No entanto, menos se sabe sobre os efeitos da atividade física materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e os efeitos adaptativos para atenuar a hipertensão induzida pela desnutrição nos filhos.

3 HIPÓTESE

HIPÓTESE I: A atividade física voluntária materna atua como um fator preventivo para alterações pressóricas e simpato-respiratórias induzidas pela desnutrição proteica materna.

HIPÓTESE II: O aumento da atividade nervosa simpática e as alterações cardiorrespiratórias encontradas na prole de mães submetidas à desnutrição proteica estão associadas a modificações na expressão de fatores de transcrição celular tais como o HIF-1 α , TH e P2X.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da atividade física voluntária materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios, bioquímicos e a modulação do balanço autonômico cardíaco na prole de ratos submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação. Assim como, nestes animais, avaliar a expressão de genes chaves no controle da excitabilidade de células nervosas no corpo carotídeo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nas ratas submetidas à gaiola de atividade física voluntária:

a) Acompanhar a ingestão alimentar de acordo com os níveis de classificação de atividade física.

Na prole de ratos provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica durante a gestação e lactação e que praticaram atividade física voluntária:

- a) Acompanhar o ganho de massa corporal;
- b) Investigar os parâmetros bioquímicos;
- c) Avaliar os parâmetros cardiovasculares;
- d) Mensurar a variabilidade cardiovascular;
- e) Analisar os parâmetros respiratórios;
- f) Averiguar a expressão gênica de HIF-1 α , receptores P2X e TH no CB.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 30 ratas albinas nulíparas da linhagem Wistar, 85 a 90 dias de vida, com peso corporal compreendido entre 220 e 260 g e seus filhotes machos (n=78). Os animais foram provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), procedentes de mães que passaram ou não por desnutrição proteica durante a gestação e lactação. Os mesmos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (aproximadamente 4 animais/gaiola), com água filtrada e ração *ad libitum*, num ciclo claro e escuro de 12/12h [ciclo claro (06:00 às 18:00 horas) e ciclo escuro (18:00 às 06:00 horas)], e com temperatura (22 a 25 °C) e umidade (55 a 65%) controladas. Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (número do protocolo 23076.062778/2014-38 – **ANEXO A**) e seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

As ratas nulíparas (n=20) foram alojadas individualmente em gaiolas de atividade física voluntária (GAFV) por um período de adaptação de 30 dias. Durante esse período os animais receberam dieta de manutenção para roedores, a AIN-93M (**tabela 1**) (REEVES, NIELSEN et al., 1993). As outras ratas (n=10) permaneceram durante todo o experimento em gaiola padrão de biotério, sem acesso a roda de corrida (cicloergômetro), sendo consideradas como grupo controle.

Após o período de adaptação, as ratas foram colocadas em gaiola padrão para animais de biotério feita de polipropileno (33x40x17cm) para o acasalamento na proporção de 1 macho para 1 fêmea. A observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1º dia de prenhez (MARCONDES, BIANCHI et al., 2002). Logo após, as ratas foram recolocadas nas suas respectivas gaiolas de atividade física e divididas aleatoriamente em dois grupos. Um grupo que recebeu dieta normoproteica (grupo NP: 17% de proteína, **tabela 1**) (REEVES, NIELSEN et al., 1993), e um outro grupo que recebeu a dieta hipoproteica (grupo LP: 8% de proteína, **tabela 1**). Ambos os grupos receberam suas respectivas dietas durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e lactação (21 dias).

Tabela 1. Composição das dietas.

Ingredientes	AIN-93M* g/100g	AIN-93G*	
		NP	LP
Amido de milho (87% carboidratos), g	46.47	39.74	50.34
Caseína (proteína ≥80%), g	14.10	20.00	9.41
Amido dextrinizado, g	15.50	13.20	13.20
Sacarose, g	10.00	10.00	10.00
Óleo de soja, g	4.00	7.00	7.00
Celulose, g	5.00	5.00	5.00
Mix Mineral (AIN-93M-MX)*, g	3.50	-	-
Mix Mineral (AIN-93G-MX)*, g	-	3.50	3.50
Mix Vitamínico (AIN-93-VX)*, g	1.00	1.00	1.00
L-Metionina, g	0.18	0.30	0.30
Bitartarato de colina (41,1% choline), g	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone (TBHQ), g	0.008	0.014	0.014
Macronutrientes			
Energia total (cal/g)	3.44	3.56	3.56
Proteínas	14%	18%	8%
Lipídios	11%	18%	18%
Carboidratos	75%	64%	74%

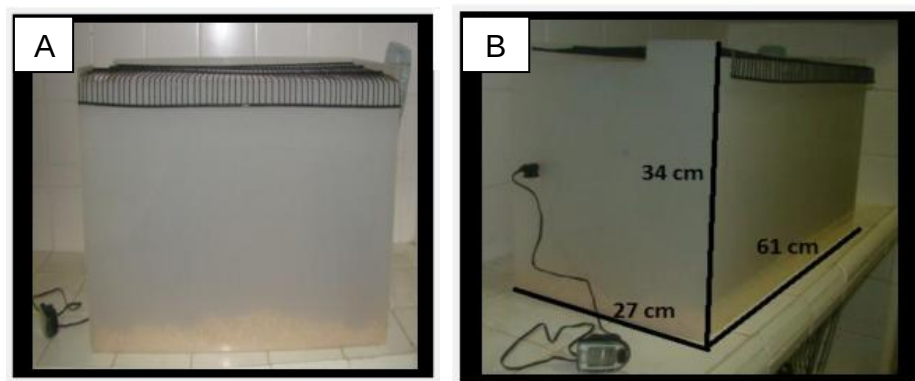
*(REEVES, NIELSEN et al., 1993)

O grupo controle também foi colocado para acasalar e após a confirmação da prenhez receberam dieta NP e LP durante todo o período de gestação e lactação. Após o parto (24h de vida), cada ninhada foi ajustada para oito filhotes (com o máximo de filhotes machos, sendo utilizadas as fêmeas apenas para completar a ninhada). A partir do desmame (22º dia de vida) os filhotes passaram a receber dieta padrão de biotério (PRESENCE®, Brasil) até o fim do experimento. Após o desmame as ratas e ratos utilizados para obtenção da prole e a prole de fêmeas sofreram eutanásia com uma overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 50 mg/mL, 40mg/Kg, i.p.) e armazenados no freezer a -20°C para posterior incineração. Quando

a ninhada apresentava menos de oito ratos, filhotes fêmeas foram utilizadas para padronização do tamanho da ninhada. Três animais de cada ninhada foram selecionados para estudos funcionais e dois animais para os estudos moleculares.

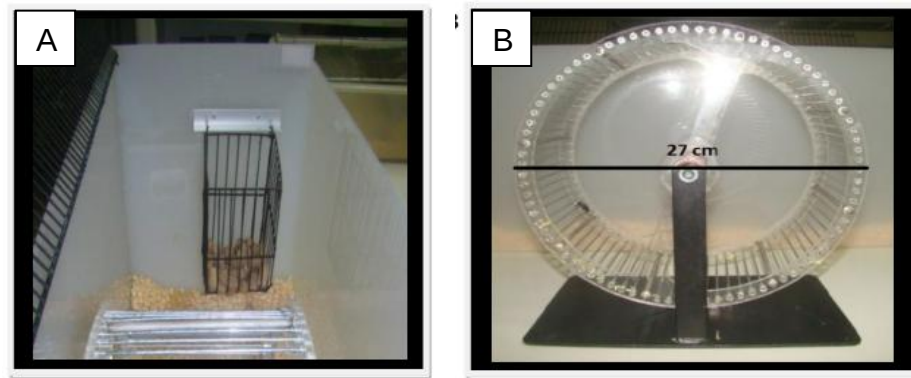
5.2 GAIOLA DE ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA

Foram utilizadas GAFV de acrílico com as seguintes dimensões: 27 cm de largura, 34 cm de altura e 61 cm de comprimento (**Figura 1 A e B**). Em uma das extremidades foi posicionado um cicloergômetro (roda de corrida) com 27 cm de diâmetro, composto por acrílico e raios em aço inoxidável (**Figura 2 A e B**). Acoplado a gaiola e ao cicloergômetro havia um sistema de monitoramento por sensor (ciclocomputador Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan) que permitiu o registro de algumas grandezas físicas relacionadas à prática de atividade física, como: distância percorrida (Km), estimativa do gasto calórico ($\text{Km.s}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e tempo de atividade física (minutos) (**Figura 3 A-D**).



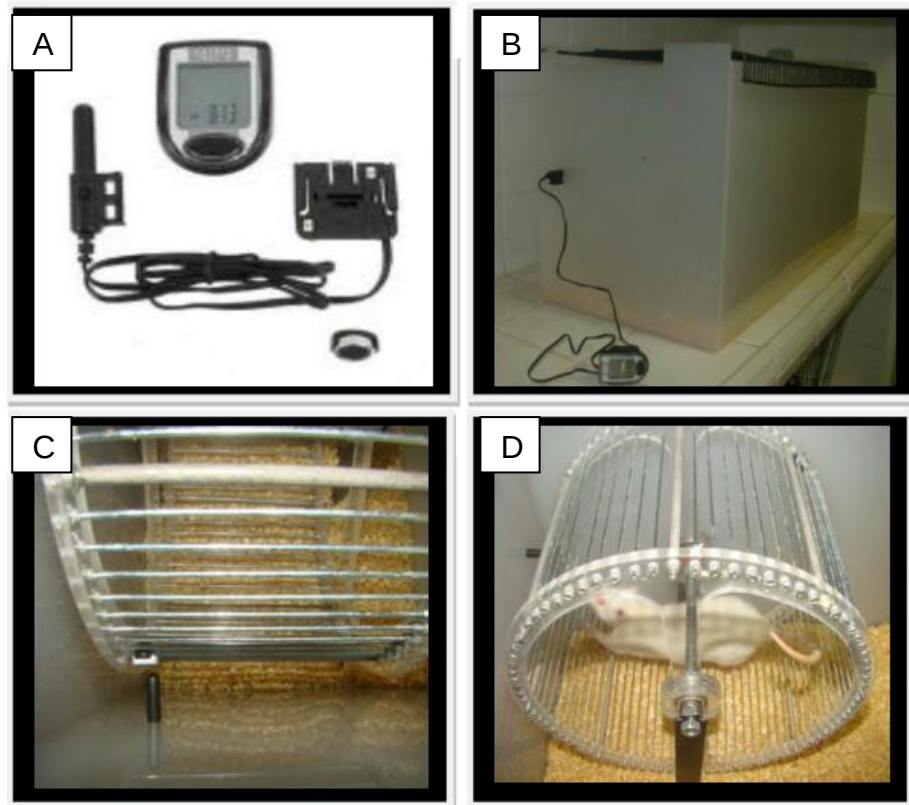
Fonte: Jéssica Fragoso.

Figura 1: Visão lateral da gaiola de atividade física voluntária (A) e suas dimensões (B).



Fonte: Jéssica Fragoso.

Figura 2. Gaiola de atividade física voluntária com cicloergômetro e comedouro (A) e cicloergômetro fora da Gaiola de atividade física voluntária (B).



Fonte: Jéssica Fragoso.

Figura 3. Esquema do funcionamento do ciclocomputador com os sensores [Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan]. Componentes do ciclocomputador (A). Posicionamento de um sensor na porção externa da GAFV, acoplado ao ciclocomputador (B). Visão interna dos sensores, um acoplado ao cicloergômetro e outro na GAFV (C). Rata realizando atividade física (D).

5.3 PROTOCOLO DE ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA

As ratas nulíparas (n=20) aos 85-95 dias de vida foram colocadas individualmente nas GAFV para um período de adaptação. A atividade física das ratas foi avaliada pela movimentação do cicloergômetro e quantificada através dos sensores acoplados na gaiola. Foram registrados diariamente: Distância percorrida (km), estimativa do gasto calórico ($\text{km.s}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e o tempo de atividade (min), para classificar as ratas de acordo com o nível diário de atividade física em: Inativas ou Ativas, seguindo uma adaptação do protocolo padronizado por Santana Muniz em seu estudo anterior (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014) (**Tabela 2**). O grupo controle não realizou atividade física e foi mantido em gaiola padrão para animais de biotério, sem o cicloergômetro. No 14º dia de lactação o cicloergômetro era bloqueado impossibilitando a prática de atividade física pela mãe e pelos filhotes, no intuito de não promover um ambiente que permitisse a prática de atividade pela prole e evitando também que alguns filhotes sofressem acidentes com o cicloergômetro.

Tabela 2: Classificação dos grupos experimentais de acordo com a atividade física diária (distância percorrida, gasto calórico e tempo de atividade) no cicloergômetro.

Grupos experimentais	n	Distância percorrida (Km.dia^{-1})	Gasto Calórico (Kcal.dia^{-1})	Tempo de atividade (min.dia^{-1})
Controle	10	0	0	0
Inativo	10	< 1.0	< 10.0	< 20.0
Ativo	10	>1.0	>10.0	>20.0

(SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014)

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de adaptação (30 dias), foram formados os seguintes grupos experimentais: Controle (sem GAFV, n=10), Inativo (n=10) e Ativo (n=10). Após o período de adaptação, os animais foram colocados para acasalamento, após confirmação de prenhez os animais receberam dieta NP ou LP, formando assim os seguintes grupos: Controle Normoproteico (NP, n=5), Controle Hipoproteico (LP,

n=5), Inativo Normoproteico (NP-inativo, n=5), Inativo Hipoproteico (LP-inativo, n=5), Ativo Normoproteico (NP-ativo, n=5) e Ativo Hipoproteico (LP-ativo, n=5). Os grupos receberam suas respectivas dietas durante todo o período de gestação e lactação. No desmame (21 dias de vida), cada ninhada (composta por 3 filhotes machos) foi utilizada para as análises funcionais (**Figura 4**) e outra parte da ninhada (composta por 2 animais) foi utilizada para as análises de biologia molecular (**Figura 5**).

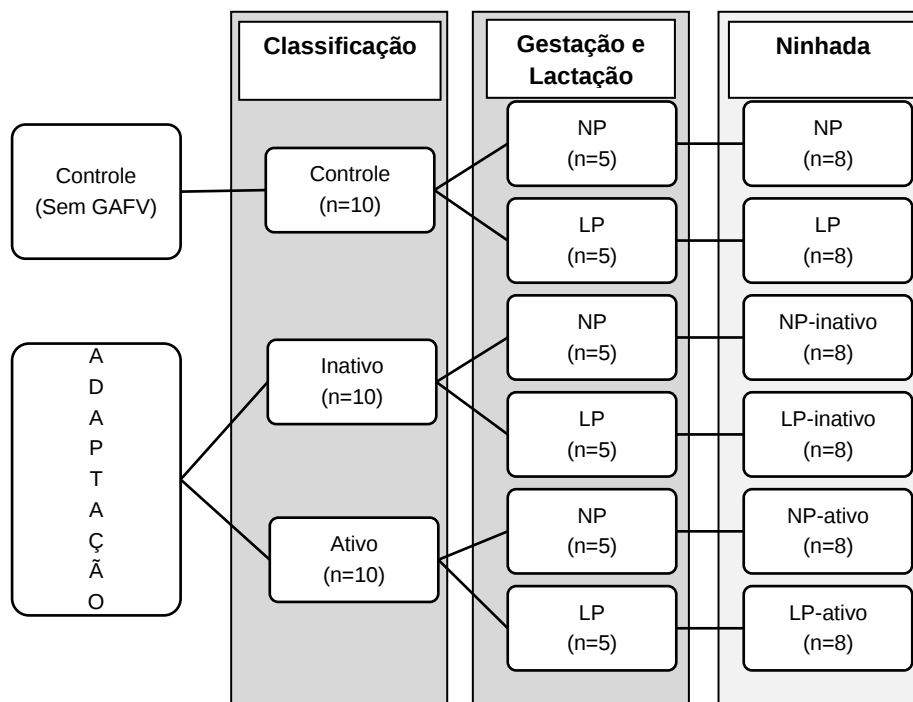


Figura 4. Esquema de formação dos grupos experimentais para as análises funcionais.

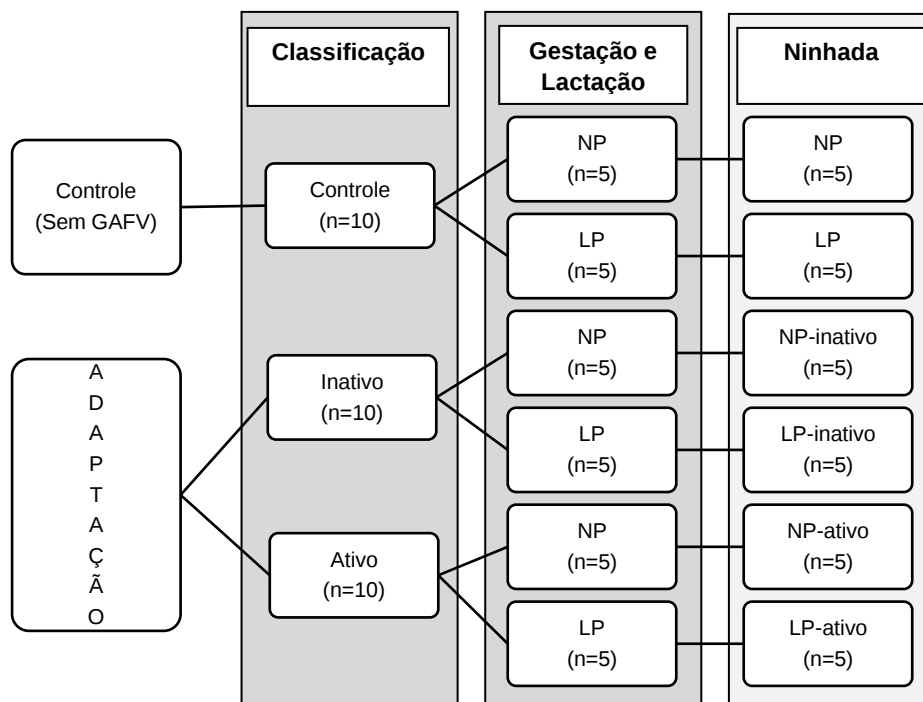


Figura 5. Esquema de formação dos grupos experimentais para as análises de biologia molecular.

5.5 ACOMPANHAMENTOS DE INGESTÃO ALIMENTAR DAS MÃES

A ingestão de alimentos foi monitorada diariamente durante a adaptação, gravidez e aleitamento. Para cálculo da ingesta alimentar foi levado em consideração a quantidade de dieta ofertada e a quantidade de dieta rejeitada após 24h [**Cosumo alimentar = dieta ofertada (g) – dieta não consumida (g)**], como previamente descrito por Brito-Alves et al., (2014). Esse acompanhamento foi realizado com o auxílio de uma balança semianalítica com capacidade máxima de 5.000g e sensibilidade de 0,1g (GEHAKA®, São Paulo, Brasil).

5.6 ACOMPANHAMENTOS DO GANHO DE MASSA CORPORAL DA PROLE

A massa corporal, expressa em gramas (g), foi avaliada semanalmente nas mães durante a gestação e lactação, e nos filhotes no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida, através de uma balança semianalítica com capacidade máxima de 5.000g e sensibilidade de 0,1g (GEHAKA®, São Paulo, Brasil).

5.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO DA PROLE

As coletas de sangue foram realizadas via plexo orbital, no 22º dia de vida da prole. As amostras foram condicionadas em tubos sem anti-coagulante e submetidas a centrifugação a 3500 RPM por 10 minutos a 4°C para obtenção do soro. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferido para um tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL, o qual foi encaminhado para realização das análises bioquímicas de albumina, proteínas totais, colesterol total, glicose de jejum e triglicerídeos, utilizando-se seus respectivos kits comerciais e analisados em analisador bioquímico.

5.8 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Um dia antes do estudo, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p. - CEVA, Paulínia/SP, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, i.p. - CEVA, Paulínia/SP, Brasil). Para a confirmação da anestesia alguns cuidados foram tomados como a perda da sensibilidade da preensão da cauda, das pernas anteriores e posteriores e do reflexo ocular. Após a confirmação foi inserido um cateter de polietileno na artéria femoral esquerda do animal (PE-50 conectado ao PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA), para posterior registro da pressão arterial. O cateter foi preenchido com salina heparinizada (NaCl 0.9% + heparine 0.05%) e na sua extremidade era colocado uma agulha preenchida de parafina para que não acontecesse o retorno sanguíneo. Logo em seguida exteriorizado subcutaneamente até a altura das escápulas. Logo após a finalização do procedimento cirúrgico, os animais receberam anti-inflamatório e analgésico (ketoprofen 5 mg.kg⁻¹, s.c. - Medley, Brasília/DF, Brasil).

Após o período de recuperação de 24 horas, com o intuito de avaliar se o animal havia se recuperado bem do procedimento cirúrgico e estava livre de dor, stress e sofrimento foi observado a pressão arterial e a frequência cardíaca (levando em consideração os limites dessas variáveis para ratos Wistar com 30 dias de vida). Além disso, observamos se houve perda de peso após o procedimento cirúrgico. Todos esses sinais foram utilizados para indicação de que os animais se recuperaram da anestesia.

Após essa confirmação de recuperação o animal era colocado dentro de uma caixa pletismográfica de corpo inteiro (para possibilitar a análise simultânea dos parâmetros respiratórios) a pressão arterial pulsátil (PAP), a pressão arterial média (PAM- obtida através da pressão arterial pulsátil), a pressão arterial sistólica e diastólica (PS e PD, respectivamente - obtida através da pressão arterial pulsátil) e a frequência cardíaca (FC - obtida através da pressão arterial pulsátil) foram registrados em animais não anestesiados e com livre movimentação dentro da caixa, durante o ciclo claro das 9h am às 15h pm.

Para obtenção do registro a agulha com parafina era removida e o cateter arterial era conectando a um transdutor mecanoelétrico de pressão. Os sinais foram amplificados (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Austrália), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado em 1000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (ChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise (offline).

5.9 ANÁLISE DA VARIABILIDADE

Com posse dos componentes oscilatórios obtidos de ratos dos grupos NP e LP foi quantificado a variabilidade cardíaca em duas bandas de frequência: baixa frequência (LF: 0,20-0,75 Hz), representativa dos efeitos moduladores da atividade simpática que controla o tônus vascular e a atividade cardíaca; e Alta Frequência (HF: 0,75-3,0 Hz), associada a uma modulação respiratória ou parassimpática do coração (MALLIANI, PAGANI et al., 1991; BERNARDI, PORTA et al., 2001; ZOCCAL, BONAGAMBA et al., 2009). Para avaliar o índice simpatovagal, calculou-se a relação LF/HF da variabilidade. Além disso, o componente cardíaco da sensibilidade barorreflexa espontânea foi calculado através de um método de sequência usando o software CardioSeries (versão 2.4, disponível em <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>) (TEZINI, DIAS et al., 2013; BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015).

5.10 MEDIDAS DA VENTILAÇÃO PULMONAR

As medidas de ventilação foram obtidas no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida. Para aquisição dos sinais de ventilação os animais foram mantidos dentro de uma

caixa pletismográfica de corpo inteiro por um período de adaptação de 30-40 min (MALAN 1973). O volume dessa caixa foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa de acordo com a idade do animal. Para as idades de 1º e 7º dia de vida era utilizado uma caixa pletismográfica de 1 L e para as idades de 14º, 21º e 30º dia de vida foi utilizado uma caixa de 5 L.

Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar é interrompido e a câmara do animal permanece totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações causadas pela movimentação da caixa torácica são captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal é então enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments). A calibração do volume de ar foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar de 0.1 mL para a caixa de 1 L e 1 mL para a caixa de 5 L dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada. Três variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (FR), o volume corrente (VT) e a ventilação (VE).

5.11 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Um grupo de animais, aos 30 dias de vida, livre de qualquer procedimento experimental, foram separados para análise da expressão gênica de HIF-1 α , P2X e TH. Os animais passaram por um período de jejum de 6h e logo em seguida foram eutanaziados através do uso de uma guilhotina. Imediatamente os CB foram removidos, congelados e armazenados a -80º C.

5.12 EXTRAÇÃO DE MRNA

O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando o reagente TRIzol™ Reagent (Ambion®, Ambion Europe) e clorofórmio hidratado com água DEPC (dietil pirocarbonato), seguido de precipitação com isopropanol, lavagem com etanol a 70%, centrifugação e ressuspensão com H₂O DEPC, e posteriormente tratado com TURBODNAase (Ambion®, Ambion Europe), com o objetivo de eliminar contaminantes de DNA genômico. A concentração e qualidade do RNA total foram

determinadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000. As amostras de RNA foram quantificadas através de espectrofotometria ($\lambda = 260$ nm) e análise em gel de agarose 1% em comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, Califórnia, EUA).

5.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

A RT-PCR quantitativa foi realizada com o kit Quantitect SYBR™ Green RT-PCR (QIAGEN) e 100ng de RNA. Todas as reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas em duplicata, no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Cada amostra foi amplificada em um termociclador Applied Biosystems® 7500, software v.2.0.6. O programa de RT-PCR quantitativa se deu nas seguintes etapas: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (mix sem molde de RNA). A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene *beta-actina* foi usado como controle endógeno, usando primers específicos (**tabela 3**). A reação de RT-PCR quantitativa foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do Sybr-Green I, na qual todas as amostras puderam ser comparadas. A fluorescência emitida foi captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o *software* fez a análise final dos dados.

Tabela 3. Sequências de primers utilizados para análise de RT-PCR.

Gene	F/R	Sequência 5'-3'	Tm (°C)
β -actin	F	CCTGACCCTGAAGTACCCCATTTG	60
	R	CATGGCTGGGGTGTTGAAGGTC	
HIF-1 α	F	GCGAGAACGAGAAGAAAAATAGG	60
	R	GCACCTAGAAGTTTCCTCACACG	
P2X2	F	TGGGACTACGAGACGCCTAA	60
	R	CAGGATGAGAAGCTGCACCA	

P2X3	F	TAAAGGGACAGGCTCCCAT	60
	R	CCTACAGGACAGGGAGACGA	
P2Y2	F	AAAGAGGAACGAACACCGGG	60
	R	GTCACGTAATGGGCTCTCCC	
TH	F	AAAGAGGAACGAACACCGGG	60
	R	GTCACGTAATGGGCTCTCCC	

F: sequência forward;

R: sequência reverse;

HIF-1 α : Sequência de Fator-1 α indutível por hipóxia;

P2X2: Receptor Purinérgico Receptor P2X 2;

P2X3: Receptor Purinérgico P2X 3;

P2Y2: Receptor Purinérgico P2Y2;

TH: Tirosina Hidroxilase.

5.15 ANÁLISES DOS DADOS

Os resultados estão expressos como média $\pm$ epm (erro padrão da média). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7[®] (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA two-way (tendo como fatores a dieta e a atividade física). Quando necessário, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 INGESTÃO DE ALIMENTO DAS MÃES DURANTE O PERÍODO DE ADAPTAÇÃO, GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Dados descritivos da ingestão alimentar durante o período de adaptação, gestação e lactação são mostrados na **Figura 6**. Durante esses três períodos, os grupos NP-ativo e LP-ativo apresentaram aumento da ingestão alimentar quando comparados aos respectivos pares (NP, LP, NP-inativo e LP- inativo).

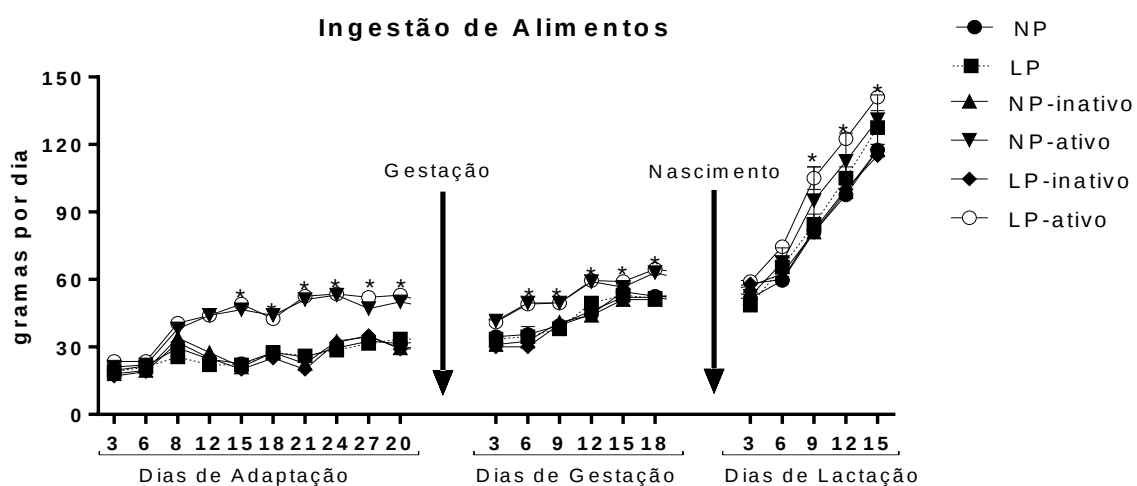


Gráfico 1. Consumo alimentar durante os períodos de adaptação, de gestação e de lactação. Durante os períodos de adaptação e gestação, os grupos foram constituídos por NP (n = 5), LP (n = 5), NP inativo (n = 5), NP-ativo (n = 5), LP inativo (n = 5). e LP-ativo (n = 5). Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * p < 0,05 usando ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Bonferroni.

6.2 GANHO DE MASSA CORPORAL DA PROLE

O acompanhamento de ganho de massa corporal da prole foi realizado no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida conforme **Figura 7 A e B**. Durante essas idades de vida a prole LP-inativo apresentou menor massa corporal quando comparado com os grupos LP, NP-inativo, LP-ativo.

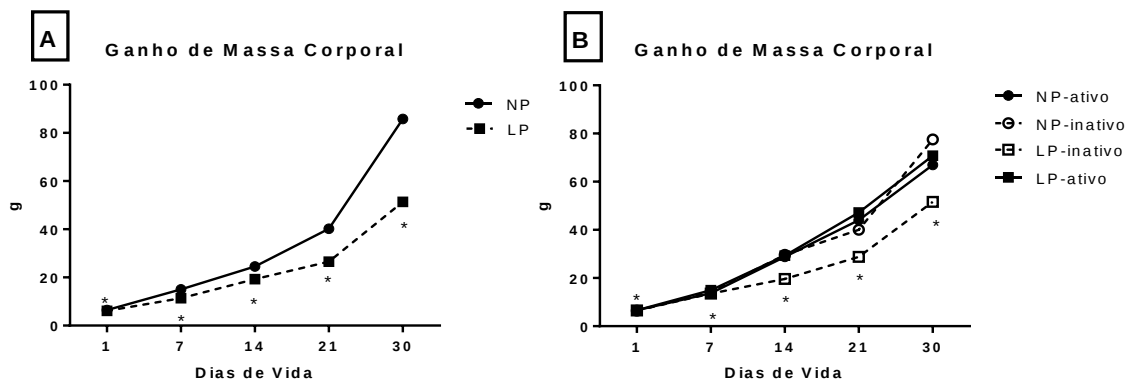


Gráfico 2. Ganho de massa corporal da prole no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida do grupo NP (n = 6), LP (n = 6), NP inativo (n = 6), NP-ativo (n = 6), LP inativo (n = 6). e LP-ativo (n = 6). Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ usando ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni.

6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO DA PROLE

O grupo LP apresentou redução na concentração sérica de proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol e aumento na concentração sérica de glicose de jejum quando comparado ao grupo NP (**Tabela 4**). A atividade física materna não altera os parâmetros bioquímicos, pois o grupo NP-ativo foi semelhante ao NP e NP-inativo. No entanto, nos grupos LP e LP-inativos, a atividade física materna, quando categorizada como ativa, foi capaz de normalizar os parâmetros bioquímicos, e os filhotes LP-ativos apresentaram os mesmos parâmetros bioquímicos dos filhotes NP-ativos. Filhotes LP-inativo mostraram não haver diferenças em termos de parâmetros bioquímicos quando comparados aos filhotes de LP.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos (proteína total, albumina, triglicerídeo, colesterol total e glicose) da prole de ratos com 22 dias de idade, de mães controles, inativas e ativas submetidas a uma dieta normo-proteica (NP, 17% de proteína, n = 8) ou baixa dieta protéica (LP, 8% de proteína, n = 8) durante a gravidez e lactação.

	22 dias de vida					
	NP	LP	NP-inativo	NP-ativo	LP-inativo	LP-ativo
Proteína Total	6.1±0.1	5.3±0.1*	6.1±0.1	5.2±0.7	4.88±0.01*	5.4±0.1 [#]
Albumina	2.6±0.1	2.1±0.1*	3.1±0.1	3.2±0.2	2.1±0.1*	2.6±0.3 [#]
Triglicerídeos	130±8	77±6*	132±7	131±4	85±5*	131±4 [#]
Colesterol Total	122±11	89±6*	102±4	110±3	54±4*	117±12 [#]
Glicose	107.9±3.7	134.1±5.3*	123.6±7.1	120±10.1	187.2±5.1*	110.1±5.2 [#]

* diferenças entre LP e LP-inativo vs. NP e NP-inativo, respectivamente (p <0,05; two-way ANOVA). # diferenças entre LP e LP-inativo vs. LP-ativo (p <0,05; two-way ANOVA). Grupos: NP-inativo (descendentes de mães que receberam dieta NP e que apresentaram um fenótipo inativo), NP-ativo (filhos de mães que receberam dieta NP e que apresentaram um fenótipo ativo), LP-inativo (descendentes de mães que receberam LP dieta e que apresentavam um fenótipo inativo) e LP-ativo (prole de mães que receberam dieta LP e que apresentaram um fenótipo ativo). Os valores são apresentados como média ± S.E.M.

6.4 PARÂMETROS CARDÍOVASCULARES

Não houve efeitos da restrição proteica materna e da atividade física sobre os parâmetros hemodinâmicos na prole aos 30 dias de idade (**Figura 8**). No entanto, a análise espectral da PS em filhotes LP e LP-inativo mostrou um aumento nas oscilações de baixa frequência - oscilações LF (**Figura 9A**) quando comparados com os grupos NP e NP-inativo, respectivamente. As análises espectrais dos filhotes NP-ativo foram semelhantes aos filhotes NP e NP-inativo. No entanto, os filhotes LP-ativo mostraram uma redução desses parâmetros quando comparados ao LP e LP-inativo. Os componentes HF da pressão arterial não apresentaram diferenças entre os grupos (**Figura 9B**). Os grupos LP e LP-inativo mostraram um aumento na relação LF/HF (pulso de intervalo), mas o LP-ativo mostrou resultados semelhantes

quando comparado com o NP-ativo (**Figura 9C**). Na variabilidade da FC avaliada pela análise simbólica, a porcentagem de ocorrências dos padrões das sequências de 0V e 2V não se alterou entre os grupos (**Figura 9D**).

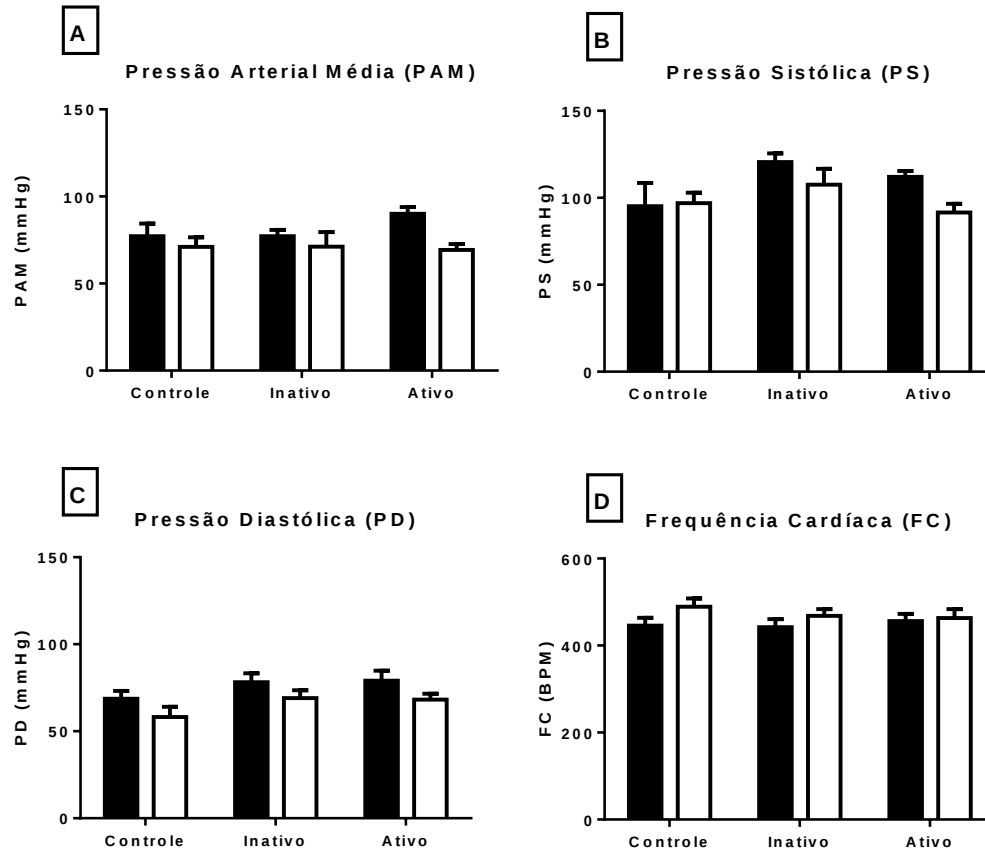


Gráfico 3. Parâmetros cardíacos (A, pressão arterial média - PAM, B, pressão sistólica - PS, C, pressão diastólica - DP e D, frequência cardíaca - FC) de filhotes de ratos, aos 30 dias de vida. Os grupos foram constituídos por NP (n = 8), LP (n = 8), NP-inativo (n = 8), NP-ativo (n = 8), LP-inativo (n = 8) e LP-ativo (n = 8). Os valores são apresentados como médias ± S.E.M. * p < 0,05 usando ANOVA two-way.

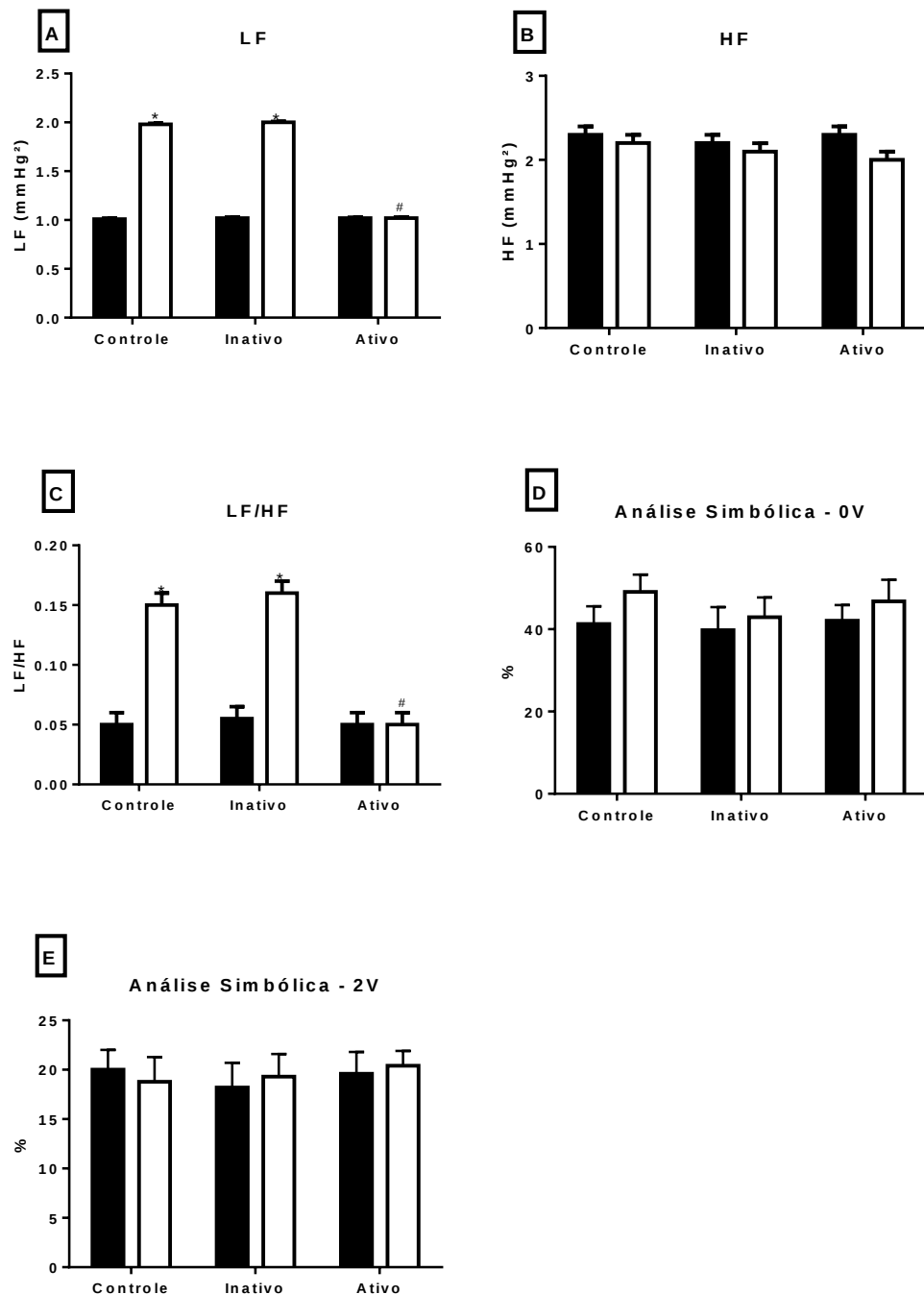


Gráfico 4. Variabilidade cardiovascular da pressão arterial sistólica (PAS). As bandas de baixa frequência - LF (A), bandas de alta frequência - HF (B), relação LF/HF (C), variabilidade não-linear da frequência cardíaca das sequências de 0V (D) e variabilidade não-linear da frequência cardíaca das sequências de 2V (E) de filhotes de ratos, com 30 dias de vida provenientes de mães submetidas a uma dieta de normoproteica (NP, 17% de proteína, n=8) ou hipoproteica (LP, 8% de proteína, n=8) durante a gestação e lactação. E de mães que realizavam atividade física voluntária (NP-inativo, n = 8, NP-ativo, n = 8, LP-inativo, n = 8 e LP-ativo, n = 8). Os

valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M, $p < 0,05$. * e # Os valores são apresentados como médias $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ usando ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.

6.5 MEDIDAS DA VENTILAÇÃO PULMONAR

Os filhotes de LP apresentaram uma redução na FR do 1º ao 14º dia de vida (**Figura 10A**) quando comparados aos filhotes NP. Não houve diferenças quando os filhotes NP-ativo foram comparados aos filhotes NP e NP-inativo. No entanto, os filhos de mães ativas, independentemente do estado nutricional, não apresentaram alterações respiratórias, uma vez que os filhotes LP-ativo apresentaram níveis ventilatórios semelhantes aos do NP-ativo. Além disso, filhotes de LP mostraram FR semelhante aos filhotes LP-inativo (**Figura 10B**). Em relação à VT (**Figura 10C e D**) e VE (**Figura 10E e F**), todos os grupos apresentaram os mesmos valores aumentados aos 21 dias de idade.

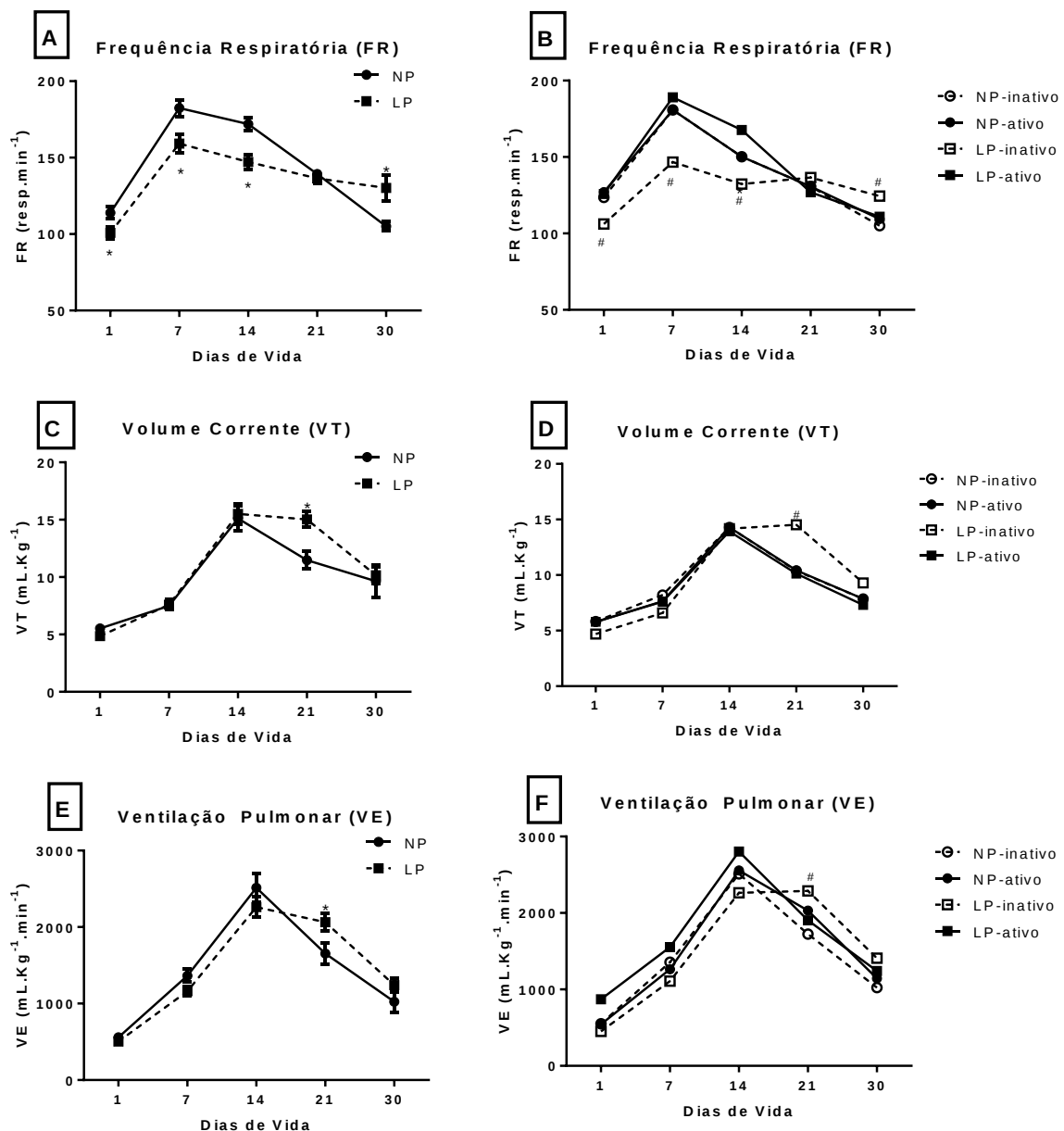


Gráfico 5. Parâmetros ventilatórios (frequência respiratória - FR, volume corrente - VT e ventilação pulmonar - VE) de descendentes de ratos, aos 1, 7, 14, 21 e 30 dias de idade. Os grupos foram constituídos por NP ($n = 8$), LP ($n = 8$), NP-inativo ($n = 8$), NP-ativo ($n = 8$), LP-inativo ($n = 8$) e LP-ativo ($n = 8$). A, C e E mostram os parâmetros ventilatórios de ratos que não tiveram atividade física (grupos NP e LP), B, D e F mostram os parâmetros inativo e ativo dos grupos. Os valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M. * Os valores médios foram significativamente diferentes daqueles do grupo NP ($p < 0,05$; teste de Student não pareado). # Os valores médios foram significativamente diferentes após a análise intragrupo (ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni).

6.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

Os animais LP e LP inativo mostraram uma regulação positiva do RNAm de HIF-1 α (**Figura 11A**) quando comparados com os filhotes de NP e NP-inativo. Os filhotes NP-ativo apresentaram resultados semelhantes quando comparados com os filhotes NP e NP-inativo. Os filhotes LP-ativo mostraram níveis semelhantes aos dos filhotes NP-ativo. Em relação à expressão dos receptores purinérgicos P2X2 (**Figura 11B**), P2X3 (**Figura 11C**), P2Y2 (**Figura 11D**) e expressões TH (**Figura 11E**), não houve diferenças entre os grupos, nem a dieta nem o nível de atividade física materna foram capaz de alterar a expressão gênica.

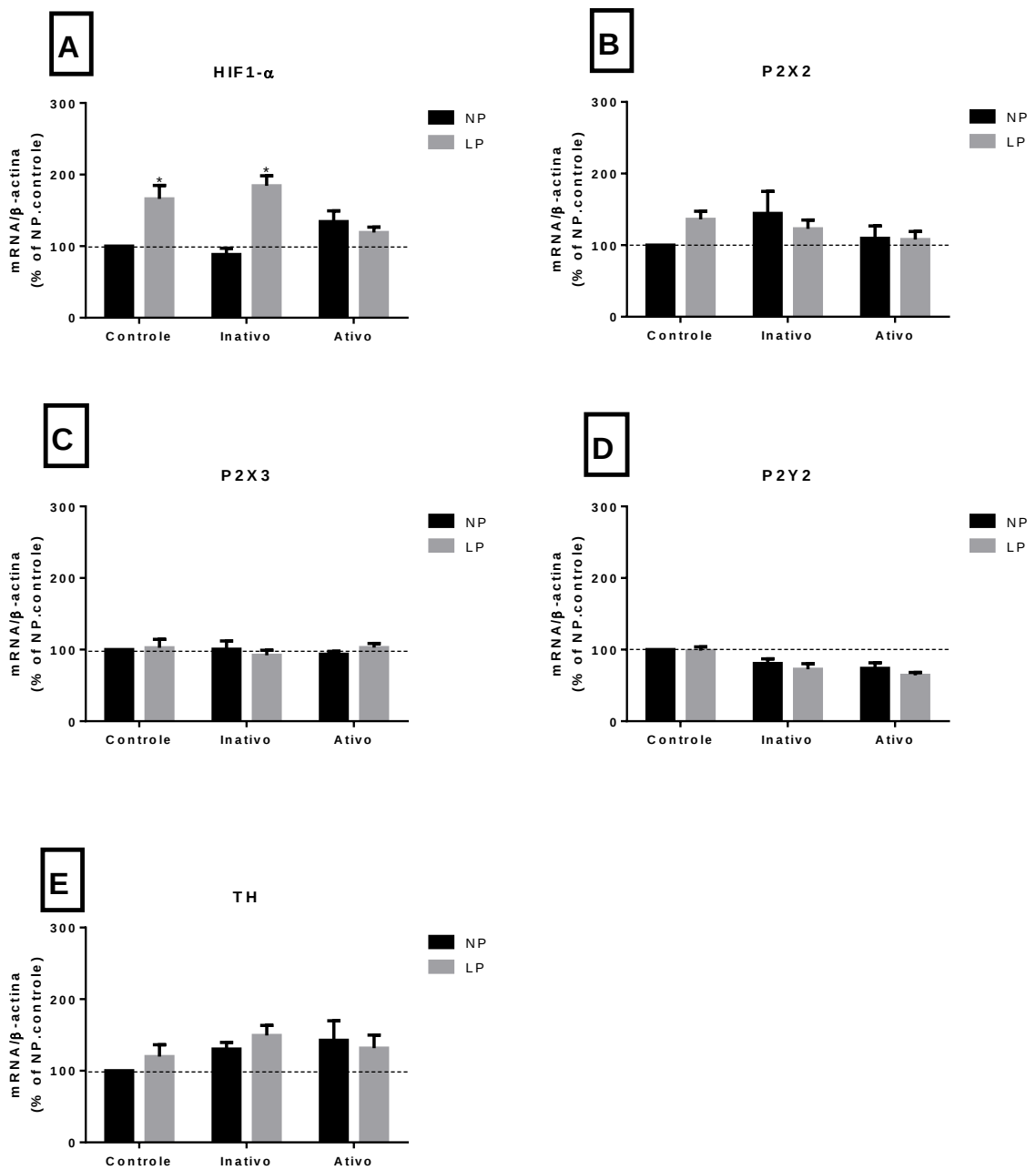


Gráfico 6. Expressão de HIF-1α (A), P2X2 (B), P2X3 (C), P2Y2 (D) e TH (E) em CB de descendentes de ratos, com 30 dias de idade, de mães submetidas à dieta normoproteica (NP, 17% de proteína, n=5) ou hipoproteica (LP, 8% de proteína, n=5) durante a gravidez e lactação. E de mães que realizavam atividade física voluntária (NP-inativo, n=5, NP-ativo, n=5, LP-inativo, n=5 e LP-ativo, n= 5). Os valores são apresentados como média $\pm$ S.E.M, $p < 0,05$. * Os valores médios foram significativamente diferentes após análise intragrupo (ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni).

7 DISCUSSÃO

A gravidez requer um aumento significativo da secreção de insulina estimulada pela glicose em condições de normoglicemia. No entanto, a desnutrição materna está relacionada à perda da sensibilidade à glicose e à capacidade secretora nas ilhotas pancreáticas, redução das proteínas séricas, como albumina e pré-albumina, colesterol total e indicadores do metabolismo lipídico (BHARADWAJ, GINOYA et al., 2016; BLESSON, CHINNATHAMBI et al., 2017). No presente estudo, a dieta materna pobre em proteínas (8% de proteína) causou uma redução na concentração sérica de proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol e um aumento na glicemia de jejum. O comprometimento dos marcadores bioquímicos do estado nutricional e da homeostase da glicose pode levar ao diabetes mellitus gestacional e ao aumento do risco de doenças crônicas mais tarde na vida (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012). Por outro lado, a atividade física materna preveniu o desenvolvimento de alterações nos níveis de glicose, proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol. Nossos dados estão alinhados com estudos anteriores sobre os efeitos da reprogramação da atividade física materna em ratos desnutridos (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013).

Da mesma forma, observou-se aumento da ingestão de alimentos induzida pela atividade física materna, independente do estado nutricional. Esses efeitos são particularmente importantes devido à recuperação da perda de flexibilidade metabólica induzida pela restrição proteica no músculo esquelético, uma vez que a disfunção metabólica materna e o crescimento deficiente do feto têm sido associados ao desenvolvimento de várias doenças crônicas na vida adulta (Costa-Silva, de Brito-Alves et al. 2015; de Brito Alves, Toscano et al. 2017).

A disfunção respiratória durante o desenvolvimento é um importante fator prognóstico para o curso da hipertensão arterial neurogênica e a expectativa de vida de indivíduos que sofreram desnutrição perinatal (NUYT and ALEXANDER 2009; TAYLOR, SAMUELSSON et al., 2014; COSTA-SILVA, DE BRITO-ALVES et al., 2015). O tônus nervoso simpático para o sistema cardiovascular exibe alterações notáveis relacionadas à função respiratória que levam a oscilações rítmicas na pressão arterial em ratos jovens e adultos submetidos a uma restrição materna de baixa proteína (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015). No presente estudo, nossos dados mostraram uma redução da FR em filhotes de 1 a 14 dias de idade

que foram submetidos a restrição de proteína, além desses animais apresentarem aumento de VT e VE aos 21 dias de idade. Tem sido relatado que a prole de ratos (35 dias de vida) provenientes de mães com insuficiência uteroplacentária, induzida por ligadura bilateral dos vasos uterinos aos 18 dias de gestação, também é hipertensa mais tarde na vida (MENUET, WLODEK et al., 2016). De fato, ratos desnutridos durante o período perinatal apresentam uma resposta simpática e bradicárdica aumentada à ativação de quimiorreceptores periféricos (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014). Embora todos os parâmetros respiratórios não tenham sido diferentes entre os grupos, observamos uma função respiratória aumentada em ratos de mães ativas, mesmo no grupo com restrição proteica. O mecanismo subjacente pode estar relacionado ao aumento do fator de crescimento insulínico (IGF-1) e seu receptor (IGF-1R) (MANGWIRO, CUFFE et al., 2018), já que o exercício pode induzir uma remodelação vascular na placenta (KRAMER, BEATTY et al., 2002). Essas observações reforçam a visão de que o exercício físico materno atua positivamente na função respiratória de filhotes desnutridos, o que representa importante indicação precoce de proteção ao desenvolvimento de sinais de hipertensão.

A análise espectral da pressão arterial e a variabilidade da frequência cardíaca são usadas para descrever flutuações rítmicas e não-rítmicas da pressão arterial, fornecendo índices de modulação autonômica cardiovascular (PARATI, SAUL et al., 1995). No presente estudo, filhotes de ratas apresentaram aumento na oscilação das bandas LF e na relação LF/HF, mas houve alterações na oscilação do IC (pulso intervalado). O aumento da oscilação de LF está associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, principalmente hipertensão e acidente vascular cerebral (HORSMAN, PEEBLES et al., 2015). Em vez disso, descobrimos que os filhotes de mães ativas, independentemente da dieta, mostraram uma melhoria aparente na análise espectral que pode simplesmente refletir a natureza dependente da frequência do barorreflexo (KRAMER, BEATTY et al., 2002). Embora esses resultados não levem aos possíveis benefícios do exercício físico materno que mitiga a restrição proteica durante o período crítico do desenvolvimento feto-placentário, a normalização da influência simpática no sistema cardiovascular e na PA aumenta a noção de que a atividade física *per se* reforça o controle autonômico cardiovascular.

O fator de transcrição heterodimérico HIF-1 α desempenha um papel essencial para a manutenção da homeostase celular do oxigênio (SEMENZA 2007). Em resposta à hipóxia, proteínas HIF-1 α estabilizadas iniciam a expressão de genes que induzem a autorregulação do fluxo vascular em tecidos periféricos, perfusão tecidual local, pressão arterial sistêmica, taxas ventilatórias e várias respostas à oxigenação controlada pelo corpo carotídeo (SEMENZA 2007). No presente estudo, em resposta aos níveis fisiológicos de nutrientes, animais LP-inativo apresentaram aumento da expressão de RNAm de HIF-1 α no CB. O aumento da expressão dos níveis de HIF-1 α está associado à resposta precoce à isquemia miocárdica ou ao infarto e ao risco de hipertensão arterial (LEE, WOLF et al., 2000; ITO, FUNAMOTO et al., 2012). Consequentemente, o RNAm de HIF-1 α aumentou cerca de 1,3 vezes no coração fetal masculino sob desnutrição materna (baixo teor de proteína: 8,67% e na alimentação normal: 17,9%) (ITO, TANABE et al., 2011). Um estudo recente mostrou a superexpressão de HIF-1 α no CB de ratos desnutridos com 30 dias de idade (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015).

Por outro lado, a expressão dos receptores purinérgicos P2X2, P2X3, P2Y2 e expressões TH não foram afetadas pela atividade física materna ou dieta. Em contraste, a expressão do receptor P2X2 foi aumentada pela desnutrição materna (ratos privados de proteína durante a gravidez e 42 dias pós-parto) (MISAWA, GIROTTI et al., 2010). Embora a sinalização purinérgica no CB tenha sido implicada na disfunção cardiorrespiratória em alguns modelos hipertensivos (PIJACKA, MORAES et al., 2016), não foram observadas alterações na expressão de seus principais receptores no CB da prole desnutrida. Os receptores de ATP são mais expressos no CB, eles também respondem exageradamente quando o ATP é aplicado no local. Além disso, a deleção dos receptores ATP reduziu a resposta ventilatória à hipóxia em camundongos (RONG, GOURINE et al., 2003; LEONARD, SALMAN et al., 2018). Sugere que estes contribuem para o aumento da atividade do CB e seu bloqueio pode proporcionar um efeito anti-hipertensivo. No entanto, no presente estudo sugere-se que não há envolvimento da sinalização purinérgica em nosso modelo de programação materna.

Além das vias purinérgicas, a neurotransmissão adrenérgica desempenha um papel importante na modulação da atividade do CB. A dopamina é o neurotransmissor mais abundante nas células do tipo I, e sua liberação é frequentemente usada como um indicador de neurosecreção, promovendo um

aumento na atividade do CB (ZHANG, VOLLMER et al., 2017). O corpo carotídeo e as fibras nervosas sensoriais e autonômicas expressam a tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante da síntese de dopamina (ZHAO, ZHUANG et al., 2016). Alguns autores consideraram a dopamina como tendo efeito inibitório, uma vez que estímulos naturais, como hipóxia ou acidose, estão associados ao aumento da secreção de dopamina. A dopamina é um neurotransmissor capaz de inibir a atividade do corpúsculo carotídeo (NURSE 2014; BIALKOWSKA, ZAJAC et al., 2015). A infusão de dopamina é capaz de diminuir a FR. Assim, hipotetizamos que a descendência desnutrida teria uma expressão diminuída de TH no CB. No entanto, essas hipóteses não foram confirmadas pelos nossos dados. De fato, podemos sugerir que mudanças nas vias purinérgicas e dopaminérgica no CB não são modificadas pela atividade física materna e pela restrição proteica. No entanto, podemos estabelecer que todas essas alterações séricas metabólicas e cardiorrespiratórias e a superexpressão de HIF-1 α em filhotes de mães desnutridas foram resgatadas nos filhotes de mães ativas.

8 CONCLUSÃO

Assim, concluimos que a atividade física materna desempenha um papel importante na prevenção do aparecimento precoce de disfunção cardiorrespiratória induzida pela dieta hipoproteica durante o desenvolvimento. Os efeitos incluíram a recuperação da perda de flexibilidade metabólica, função ventilatória, redução do fluxo simpático para o sistema cardiovascular e normalização do fator 1α induzido por hipóxia no CB.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, A. P., MCBRYDE, F. D., et al., "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat." **J Physiol** 590(17): 4269-4277. (2012)
- ABDULQAWI, R., DOCKRY, R., et al., "P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study." **Lancet** 385(9974): 1198-1205. (2015)
- AGARWAL, K. N., PRASAD, C., et al., "Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats." **Ann Nutr Metab** 25(4): 228-233. (1981)
- ANDERSEN, L. G., ANGQUIST, L., et al., "Birth weight in relation to leisure time physical activity in adolescence and adulthood: meta-analysis of results from 13 nordic cohorts." **PLoS ONE** 4(12): e8192. (2009)
- BARKER, D. J. "The origins of the developmental origins theory." **J Intern Med** 261(5): 412-417. (2007)
- BARKER, D. J., OSMOND, C., et al., "Trajectories of growth among children who have coronary events as adults." **N Engl J Med** 353(17): 1802-1809. (2005)
- BARKER, D. J. and THORNBURG, K. L. "Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review." **Placenta** 34(10): 841-845. (2013)
- BARKER, D. J., WINTER, P. D., et al., "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease." **Lancet** 2(8663): 577-580. (1989)
- BARROS, M. A., DE BRITO ALVES, J. L., et al., "Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring." **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 25(1): 123-130. (2015)
- BARROS, R. C., BONAGAMBA, L. G., et al., "Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats." **Auton Neurosci** 97(2): 110-115. (2002)
- BAYBUTT, R. C. and MOLTENI, A. "Vitamin A and emphysema." **Vitam Horm** 75: 385-401. (2007)

BEEVERS, C. S., LI, F., et al.,. "Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells." **Int J Cancer** 119(4): 757-764. (2006)

BELL, J. M. and SLOTKIN, T. A. "Postnatal nutritional status influences development of cardiac adrenergic receptor binding sites." **Brain Res Bull** 21(6): 893-896. (1988)

BENABE, J. E., WANG, S., et al.,. "Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding." **Am J Physiol** 265(5 Pt 2): F660-669. (1993)

BERARDI, N., PIZZORUSSO, T., et al.,. "Molecular basis of plasticity in the visual cortex." **Trends Neurosci** 26(7): 369-378. (2003)

BERNARDI, L., PORTA, C., et al.,. "Modulatory effects of respiration." **Auton Neurosci** 90(1-2): 47-56. (2001)

BHARADWAJ, S., GINOYA, S., et al.,. "Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment." **Gastroenterol Rep (Oxf)** 4(4): 272-280. (2016)

BIALKOWSKA, M., ZAJAC, D., et al.,. "Inhibition of peripheral dopamine metabolism and the ventilatory response to hypoxia in the rat." **Adv Exp Med Biol** 837: 9-17. (2015)

BIOSCA, M., RODRIGUEZ, G., et al.,. "Central adiposity in children born small and large for gestational age." **Nutr Hosp** 26(5): 971-976. (2011)

BLESSON, C. S., CHINNATHAMBI, V., et al.,. "Gestational Protein Restriction Impairs Glucose Disposal in the Gastrocnemius Muscles of Female Rats." **Endocrinology** 158(4): 756-767. (2017)

BOGDARINA, I., WELHAM, S., et al.,. "Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension." **Circ Res** 100(4): 520-526. (2007)

CARROLL, J. L. "Developmental plasticity in respiratory control." **J Appl Physiol** (1985) 94(1): 375-389. (2003)

CHASE, H. P., DORSEY, J., et al.,. "The effect of malnutrition on the synthesis of a myelin lipid." **Pediatrics** 40(4): 551-559. (1967)

CLAPP, J. F., 3RD. "The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and fetoplacental growth." **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 110 Suppl 1: S80-85. (2003)

CLAPP, J. F., 3RD. "Long-term outcome after exercising throughout pregnancy: fitness and cardiovascular risk." **Am J Obstet Gynecol** 199(5): 489 e481-486. (2008)

COMROE, J. " The location and function of the chemoreceptors of the aorta." **Am J Physiol** 127: 176-191. (1939)

CORNELISSEN, V. A. and FAGARD, R. H. "Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials." **J Hypertens** 23(2): 251-259. (2005)

COSTA-SILVA, J. H., DE BRITO-ALVES, J. L., et al.,. "New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity." **Front Physiol** 6: 345. (2015)

COSTA-SILVA, J. H., SILVA, P. A., et al.,. "Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood?" **Eur J Nutr** 48(7): 437-445. (2009)

DALY, M. and UNGAR, A. "Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog." **J Physiol** 182(2): 379-403. (1966)

DALY, M. D., ANGELL-JAMES, J. E., et al.,. "Role of carotid-body chemoreceptors and their reflex interactions in bradycardia and cardiac arrest." **Lancet** 1(8119): 764-767. (1979)

DALYMDE, B., HAZZLEDINE, J. L., et al.,. "Reflex Respiratory and Peripheral Vascular Responses to Stimulation of the Isolated Perfused Aortic Arch Chemoreceptors of the Dog." **J Physiol** 177: 300-322. (1965)

DAUNCEY, M. J. and BICKNELL, R. J. "Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life." **Nutr Res Rev** 12(2): 231-253. (1999)

DE BRITO ALVES, J. L. and COSTA-SILVA, J. H. "Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms." **Clin Exp Pharmacol Physiol** 45(5): 422-429. (2018)

DE BRITO ALVES, J. L., DE OLIVEIRA, J. M., et al.,. "Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata." **Clin Exp Pharmacol Physiol**. (2016)

DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V. O., et al.,. "Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring." **J Nutr** 145(5): 907-914. (2015)

DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V. O., et al.,. "Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring." **Br J Nutr** 111(4): 606-615. (2014)

DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V.O., COSTA-SILVA, J.H. "Effects of maternal protein restriction on sympathetic-respiratory activities, O₂ chemosensitivity and HIF-1 α expression in male rat offspring." **I Congresso PanAmericano de Fisiologia**. (2014)

DE MELO MONTENEGRO, I. H., MOITA, L., et al.,. "Effects of a Moderate Physical Training on the Leptin Synthesis by Adipose Tissue of Adult Rats Submitted to a Perinatal Low-protein Diet." **Horm Metab Res** 44(11): 814-818. (2012)

EASTON, J. and HOWE, A. "The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat." **Cell Tissue Res** 232(2): 349-356. (1983)

ERICKSON, J. T. and MILLHORN, D. E. "Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats." **Brain Res** 567(1): 11-24. (1991)

FALCAO-TEBAS, F., BENTO-SANTOS, A., et al.,. "Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats." **Br J Nutr** 107(3): 372-377. (2012)

FERRARI, N. and GRAF, C. "[Recommendations for Physical Activity During and After Pregnancy]." **Gesundheitswesen** 79(S 01): S36-S39. (2017)

FIDALGO, M., FALCAO-TEBAS, F., et al.,. "Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training." **Br J Nutr** 109(3): 449-456. (2013)

FIDONE, S. and GONZALEZ, C. "Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro." **J Physiol** 333: 69-79. (1982)

FORD, A. P. and UNDEM, B. J. "The therapeutic promise of ATP antagonism at P2X3 receptors in respiratory and urological disorders." **Front Cell Neurosci** 7: 267. (2013)

FORD, A. P., UNDEM, B. J., et al.,. "P2X3 receptors and sensitization of autonomic reflexes." **Auton Neurosci** 191: 16-24. (2015)

FRAGOSO, J., LIRA, A. O., et al.,. "Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats." **Exp Physiol** 102(11): 1486-1499. (2017)

FRAGOSO, J., LIRA, A. O., et al.,. "Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats." **Exp Physiol**. (2017)

FRANCHINI, K. G. and KRIEGER, E. M. "Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN." **J Auton Nerv Syst** 42(1): 63-69. (1993)

FRANCO, M. C., CASARINI, D. E., et al.,. "Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight?" **Clin Sci (Lond)** 114(5): 375-380. (2008)

GONZALEZ, C., ALMARAZ, L., et al.,. "Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges." **Physiol Rev** 74(4): 829-898. (1994)

GOYAL, R., GOYAL, D., et al.,. "Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy." **Reprod Sci** 17(3): 227-238. (2010)

GUYTON, A. "Regulação Nervosa da Circulação e Controle Rápido da Pressão Arterial." **Tratado de Fisiologia Médica** 8ª Edição: 170-179. (1992))

HANSON, M. and GLUCKMAN, P. "Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications." **Am J Clin Nutr** 94(6 Suppl): 1754S-1758S. (2011)

HAY, N. and SONENBERG, N. "Upstream and downstream of mTOR." **Genes Dev** 18(16): 1926-1945. (2004)

HEYMANS, C. J. F. "The part played by vascular pressure and chemoreceptor in respiratory control." **Nobel Lectures - Physiology or Medicine (1922-1941). Amsterdam: Elsevier**: 460-481. (1965)

HEYMANS, J. H. C. "Sur les modifications directes et sur la regulation reflexe de l'activite du centre respiratoire de la tete isolee du chien." **Arch Int Pharmacodyn The** 33: 273-372. . (1927)

HORSMAN, H. M., PEEBLES, K. C., et al.,. "Interactions between breathing rate and low-frequency fluctuations in blood pressure and cardiac intervals." **J Appl Physiol** (1985) 119(7): 793-798. (2015)

HOWE, A., MORGAN, M., et al.,. "A comparison of the ultrastructure of the abdominal vagal paraganglia and similar tissues in the rat [proceedings]." **J Physiol** 275: 34P-35P. (1978)

HROLFSDOTTIR, L., HALLDORSSON, T. I., et al.,. "Maternal Macronutrient Intake and Offspring Blood Pressure 20 Years Later." **J Am Heart Assoc** 6(4). (2017)

HUAI, P., XUN, H., et al.,. "Physical activity and risk of hypertension: a meta-analysis of prospective cohort studies." **Hypertension** 62(6): 1021-1026. (2013)

HUANG, Y., HICKEY, R. P., et al.,. "Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart." **FASEB J** 18(10): 1138-1140. (2004)

ITO, T., FUNAMOTO, K., et al.,. "Maternal undernutrition induces the expression of hypoxia-related genes in the fetal brain." **Tohoku J Exp Med** 226(1): 37-44. (2012)

ITO, T., TANABE, K., et al.,. "Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in the fetal heart is associated with maternal undernutrition." **Tohoku J Exp Med** 224(3): 163-171. (2011)

ITO, Y., AHMAD, A., et al.,. "Hypoxia-inducible factor regulates expression of surfactant protein in alveolar type II cells in vitro." **Am J Respir Cell Mol Biol** 45(5): 938-945. (2011)

JONES, J. E., JURGENS, J. A., et al.,. "Mechanisms of fetal programming in hypertension." **Int J Pediatr** 2012: 584831. (2012)

JORDAN, D. and SPYER, K. M. "Studies on the termination of sinus nerve afferents." **Pflugers Arch** 369(1): 65-73. (1977)

KRAMER, J. M., BEATTY, J. A., et al.,. "Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity." **Clin Exp Pharmacol Physiol** 29(1-2): 122-126. (2002)

LABAYEN, I., MORENO, L. A., et al.,. "Early programming of body composition and fat distribution in adolescents." **J Nutr** 136(1): 147-152. (2006)

LAHIRI, S., ROY, A., et al.,. "Oxygen sensing in the body." **Prog Biophys Mol Biol** 91(3): 249-286. (2006)

LANDSBERG, L., ARONNE, L. J., et al.,. "Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension." **J Clin Hypertens (Greenwich)** 15(1): 14-33. (2013)

LEANDRO, C. G., FIDALGO, M., et al.,. "Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus." **J Biomed Biotechnol** 2012: 805418. (2012)

LEE, S. H., WOLF, P. L., et al.,. "Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction." **N Engl J Med** 342(9): 626-633. (2000)

LEONARD, E. M., SALMAN, S., et al.,. "Sensory Processing and Integration at the Carotid Body Tripartite Synapse: Neurotransmitter Functions and Effects of Chronic Hypoxia." **Front Physiol** 9(225). (2018)

LIM, C. S., KIRIAKIDIS, S., et al.,. "Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall." **J Vasc Surg** 58(1): 219-230. (2013)

LIU, L., XU, X., et al.,. "Increase in the prevalence of hypertension among adults exposed to the Great Chinese Famine during early life." **Environ Health Prev Med** 22(1): 64. (2017)

LOEWY, A. D. and BURTON, H. "Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat." **J Comp Neurol** 181(2): 421-449. (1978)

LOPEZ-OLMEDO, N., HERNANDEZ-CORDERO, S., et al.,. "The Associations of Maternal Weight Change with Breastfeeding, Diet and Physical Activity During the Postpartum Period." **Matern Child Health J** 20(2): 270-280. (2016)

LORITE MINGOT, D., GESTEIRO, E., et al.,. "Epigenetic effects of the pregnancy Mediterranean diet adherence on the offspring metabolic syndrome markers." **J Physiol Biochem** 73(4): 495-510. (2017)

LUGLIANI, R., WHIPP, B. J., et al.,. "A role for the carotid body in cardiovascular control in man." **Chest** 63(5): 744-750. (1973)

LUZARDO, R., SILVA, P. A., et al.,. "Metabolic programming during lactation stimulates renal Na⁺ transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways." **PLoS One** 6(7): e21232. (2011)

MAGRO-MALOSSO, E. R., SACCONI, G., et al.,. "Exercise during pregnancy and risk of gestational hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis." **Acta Obstet Gynecol Scand** 96(8): 921-931. (2017)

MAJUMDER, P. K., FEBBO, P. G., et al.,. "mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways." **Nat Med** 10(6): 594-601. (2004)

MALAN, A. "Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms." **Respir Physiol** 17(1): 32-44. (1973)

MALLIANI, A., PAGANI, M., et al.,. "Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain." **Circulation** 84(2): 482-492. (1991)

MALOYAN, A., ELI-BERCHOER, L., et al.,. "HIF-1 α -targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart." **Physiol Genomics** 23(1): 79-88. (2005)

MALPAS, S. C. "The rhythmicity of sympathetic nerve activity." **Prog Neurobiol** 56(1): 65-96. (1998)

MANGWIRO, Y. T. M., CUFFE, J. S. M., et al.,. "Maternal exercise in rats upregulates the placental insulin-like growth factor system with diet- and sex-specific responses: minimal effects in mothers born growth restricted." **J Physiol**. (2018)

MARCELINO, T. B., DE LEMOS RODRIGUES, P. I., et al.,. "Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring." **Behav Brain Res** 312: 30-38. (2016)

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., et al.,. "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." **Braz J Biol** 62(4A): 609-614. (2002)

MARSHALL, J. M. "Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation." **Physiol Rev** 74(3): 543-594. (1994)

MARTIN-GRONERT, M. S. and OZANNE, S. E. "Experimental IUGR and later diabetes." **J Intern Med** 261(5): 437-452. (2007)

MCBRYDE, F. D., ABDALA, A. P., et al.,. "The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension." **Nat Commun** 4: 2395. (2013)

MCGOWAN, S. E. "Vitamin A deficiency increases airway resistance following C-fiber stimulation." **Respir Physiol Neurobiol** 157(2-3): 281-289. (2007)

MCGOWAN, S. E., TAKLE, E. J., et al.,. "Vitamin A deficiency alters the pulmonary parenchymal elastic modulus and elastic fiber concentration in rats." **Respir Res** 6: 77. (2005)

MCKITRICK, D. J., KRUKOFF, T. L., et al.,. "Expression of c-fos protein in rat brain after electrical stimulation of the aortic depressor nerve." **Brain Res** 599(2): 215-222. (1992)

MENUET, C., WLODEK, M. E., et al.,. "Respiratory modulation of sympathetic nerve activity is enhanced in male rat offspring following uteroplacental insufficiency." **Respir Physiol Neurobiol** 226: 147-151. (2016)

MISAWA, R., GIROTTI, P. A., et al.,. "Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons." **World J Gastroenterol** 16(29): 3651-3663. (2010)

MORAES, D. J., MACHADO, B. H., et al.,. "Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy contributing to neurogenic hypertension." **J Physiol** 593(14): 3055-3063. (2015)

NAKAYAMA, K. "Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma." **Dis Chest** 40: 595-604. (1961)

NOGUEIRA, V., BRITO-ALVES, J., et al.,. "Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers." **Hypertens Res.** (2018)

NURSE, C. A. "Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors." **J Physiol** 592(16): 3419-3426. (2014)

NUYT, A. M. and ALEXANDER, B. T. "Developmental programming and hypertension." **Curr Opin Nephrol Hypertens** 18(2): 144-152. (2009)

NWAGWU, M. O., COOK, A., et al.,. "Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero." **Br J Nutr** 83(1): 79-85. (2000)

PAIXAO, A. D., MACIEL, C. R., et al.,. "Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age." **Biol Neonate** 80(3): 239-246. (2001)

PALKOVITS, M. and ZABORSZKY, L. "Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc." **Prog Brain Res** 47: 9-34. (1977)

PALLOT, D. J. "The mammalian carotid body." **Adv Anat Embryol Cell Biol** 102: 1-91. (1987)

PARATI, G., SAUL, J. P., et al.,. "Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal." **Hypertension** 25(6): 1276-1286. (1995)

PATON, J. F., SOBOTKA, P. A., et al.,. "The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases." **Hypertension** 61(1): 5-13. (2013)

PAULINO-SILVA, K. M. and COSTA-SILVA, J. H. "Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction." **Clin Exp Pharmacol Physiol**. (2016)

PEDROSA, M. L. and MORAES-SANTOS, T. "Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats." **Braz J Med Biol Res** 20(3-4): 331-338. (1987)

PIJACKA, W., MORAES, D. J., et al.,. "Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension." **Nat Med** 22(10): 1151-1159. (2016)

PISKURIC, N. A., ZHANG, M., et al.,. "Potential roles of ATP and local neurons in the monitoring of blood O₂ content by rat aortic bodies." **Exp Physiol** 99(1): 248-261. (2014)

PRABHAKAR, N. R. "Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics." **J Physiol** 591(Pt 9): 2245-2257. (2013)

PRABHAKAR, N. R. and PEERS, C. "Gasotransmitter regulation of ion channels: a key step in O₂ sensing by the carotid body." **Physiology (Bethesda)** 29(1): 49-57. (2014)

PRABHAKAR, N. R., PENG, Y. J., et al.,. "Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia." **Compr Physiol** 5(2): 561-577. (2015)

PRABHAKAR, N. R. and SEMENZA, G. L. "Oxygen Sensing and Homeostasis." **Physiology (Bethesda)** 30(5): 340-348. (2015)

PRASAD, M., FEARON, I. M., et al.,. "Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling." **J Physiol** 537(Pt 3): 667-677. (2001)

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., et al.,. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." **J Nutr** 123(11): 1939-1951. (1993)

REHAN, V. K., SAKURAI, R., et al.,. "Effects of maternal food restriction on offspring lung extracellular matrix deposition and long term pulmonary function in an experimental rat model." **Pediatr Pulmonol** 47(2): 162-171. (2012)

RIGUAL, R., LOPEZ-LOPEZ, J. R., et al.,. "Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high PCO₂ stimulation of the cat carotid body." **J Physiol** 433: 519-531. (1991)

RONG, W., GOURINE, A. V., et al.,. "Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia." **J Neurosci** 23(36): 11315-11321. (2003)

SANTANA MUNIZ, G., BESERRA, R., et al.,. "Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny." **Physiol Behav** 129: 1-10. (2014)

SCHULTZ, H. D., MARCUS, N. J., et al.,. "Mechanisms of carotid body chemoreflex dysfunction during heart failure." **Exp Physiol** 100(2): 124-129. (2015)

SEMENZA, G. L. "Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1." **Biochem J** 405(1): 1-9. (2007)

SHAW, K., MONTAGUE, W., et al.,. "Biochemical studies on the release of catecholamines from the rat carotid body in vitro." **Biochim Biophys Acta** 1013(1): 42-46. (1989)

SIMMS, A. E., PATON, J. F., et al.,. "Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?" **J Physiol** 587(Pt 3): 597-610. (2009)

SNOECK, A., REMACLE, C., et al.,. "Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas." **Biol Neonate** 57(2): 107-118. (1990)

SZOSTAK-WEGIEREK, D. "Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health." **Int J Womens Health** 6: 647-656. (2014)

TAN, Z. Y., LU, Y., et al.,. "Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR." **Circ Res** 106(3): 536-545. (2010)

TARRY-ADKINS, J. L. and OZANNE, S. E. "Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions." **Am J Clin Nutr** 94(6 Suppl): 1765S-1771S. (2011)

TAYLOR, P. D., SAMUELSSON, A. M., et al.,. "Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin." **Acta Physiol (Oxf)** 210(3): 508-523. (2014)

TEZINI, G. C., DIAS, D. P., et al.,. "Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause." **Exp Gerontol** 48(2): 147-153. (2013)

TOLLE, A., SCHLAME, M., et al.,. "Vitamin E differentially regulates the expression of peroxiredoxin-1 and -6 in alveolar type II cells." **Free Radic Biol Med** 38(10): 1401-1408. (2005)

TONKISS, J., TRZCINSKA, M., et al.,. "Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry." **Hypertension** 32(1): 108-114. (1998)

URENA, J., FERNANDEZ-CHACON, R., et al.,. "Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(21): 10208-10211. (1994)

VAAG, A. A., GRUNNET, L. G., et al.,. "The thrifty phenotype hypothesis revisited." **Diabetologia** 55(8): 2085-2088. (2012)

VAN ABEELLEN, A. F., VEENENDAAL, M. V., et al.,. "The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition." **J Hypertens** 30(12): 2255-2267. (2012)

WANG, C., WEI, Y., et al.,. "A randomized clinical trial of exercise during pregnancy to prevent gestational diabetes mellitus and improve pregnancy outcome in overweight and obese pregnant women." **Am J Obstet Gynecol** 216(4): 340-351. (2017)

WANG, Z. Z., STENSAAS, L. J., et al.,. "The co-existence of biogenic amines and neuropeptides in the type I cells of the cat carotid body." **Neuroscience** 47(2): 473-480. (1992)

WELLS, J. C. "Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities." **Am J Hum Biol** 22(1): 1-17. (2010)

WEST-EBERHARD, M. J. "Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity." **J Exp Zool B Mol Dev Evol** 304(6): 610-618. (2005)

WILLIAMS, B. "Vascular ageing and interventions: lessons and learnings." **Ther Adv Cardiovasc Dis** 10(3): 126-132. (2016)

WOLFE, L. A. and WEISSGERBER, T. L. "Clinical physiology of exercise in pregnancy: a literature review." **J Obstet Gynaecol Can** 25(6): 473-483. (2003)

WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., et al.,. "TOR signaling in growth and metabolism." **Cell** 124(3): 471-484. (2006)

YAMAOKA, S., KIM, H. S., et al.,. "Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation." **Free Radic Res** 42(6): 602-612. (2008)

YUAN, G., VASAVDA, C., et al.,. "Protein kinase G-regulated production of H₂S governs oxygen sensing." **Sci Signal** 8(373): ra37. (2015)

ZAPATA, P. "Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors?" **Respir Physiol Neurobiol** 157(1): 106-115. (2007)

ZHANG, M., PISKURIC, N. A., et al.,. "P2Y₂ receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP." **J Physiol** 590(17): 4335-4350. (2012)

ZHANG, M., VOLLMER, C., et al.,. "Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current Ih in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture." **J Physiol** 12(10). (2017)

ZHAO, L., ZHUANG, J., et al.,. "From the Cover: Prenatal Nicotinic Exposure Attenuates Respiratory Chemoreflexes Associated With Downregulation of Tyrosine Hydroxylase and Neurokinin 1 Receptor in Rat Pup Carotid Body." **Toxicol Sci** 153(1): 103-111. (2016)

ZHENG, X., WANG, Y., et al.,. "Risk of metabolic syndrome in adults exposed to the great Chinese famine during the fetal life and early childhood." **Eur J Clin Nutr** 66(2): 231-236. (2012)

ZOCCAL, D. B., BONAGAMBA, L. G., et al.,. "Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction." **Exp Physiol** 94(9): 972-983. (2009)

ZOCCAL, D. B., SIMMS, A. E., et al.,. "Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity." **J Physiol** 586(13): 3253-3265. (2008)

APÊNDICE A - ARTIGO 1 - Maternal physical activity prevents the overexpression of hypoxia-inducible factor 1- α and cardiorespiratory dysfunction in protein malnourished rats

Artigo original submetido a revista: **Scientific reports** Fator de Impacto: **4.122**

Maternal physical activity prevents the overexpression of hypoxia-inducible factor 1- α and cardiorespiratory dysfunction in protein malnourished rats

Viviane O. Nogueira¹, Luana D. S. Andrade¹, Reginaldo L. Rocha-Júnior¹, Palloma E. D. Melo¹, Elisama Helvécio², Danilo A. F. Fontes¹, Tatiany P. Romão², Carol G. Leandro¹, João H. Costa-Silva^{1*}

¹ Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão – PE, Brazil. ² Departamento de Entomologia; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ; Recife, PE, Brazil

***Corresponding author:** João Henrique Costa-Silva, Email: joao.hcsilva@ufpe.br, Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE, Rua Alta do Reservatório, S/N, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil, Phone/fax: +55 81 3114-4101

Abstract

Maternal physical activity attenuates cardiorespiratory dysfunctions and transcriptional alterations presented by the carotid body (CB) of rats. Rats performed physical activity and were classified as inactive/active. During gestation and lactation, mothers received either normoprotein (NP-17% protein) or low protein diet (LP-8% protein). In offspring, biochemical serum levels, respiratory parameters, cardiovascular parameters and the mRNA expression of hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), tyrosine hydroxylase (TH) and purinergic receptors were evaluate. LP-inactive pups presented lower RF from 1st to 14th days old, and higher RF at 30 days than did NP-inactive and NP-active pups. LP-inactive pups presented with reduced serum protein, albumin, cholesterol and triglycerides levels and an increased fasting glucose level compared to those of NP-inactive and NP-active

groups. LP and LP-inactive animals showed an increase in the cardiac variability at the Low-Frequency bands, suggesting a major influence of sympathetic nervous activity. In mRNA analyses, LP-inactive animals showed increased HIF-1 α expression and similar expression of TH and purinergic receptors in the CB compared to those of NP groups. All these changes observed in LP-inactive pups were reversed in the pups of active mothers (LP-active). Maternal physical activity is able to attenuate the metabolic, cardiorespiratory and HIF-1 α transcription changes induced by protein malnutrition.

Keywords: developmental plasticity; maternal active phenotype; respiratory frequency; blood pressure; HIF-1, rats.

1. Introduction

In recent years, epidemiological data from human studies and experimental evidence have verified the importance of maternal nutrition during gestation and lactation in the genesis of hypertension in adult offspring (VICTORA, ADAIR et al., 2008; NUYT and ALEXANDER 2009; DE BRITO ALVES, DE OLIVEIRA et al., 2016; HROLFSDOTTIR, HALLDORSSON et al., 2017; LORITE MINGOT, GESTEIRO et al., 2017). The potential long-term implications of undernutrition on the clinical manifestation of programmed hypertension are particularly critical because a high percentage of adults living in low-income and middle-income countries were born undernourished and have to adapt to prompt changes in postnatal diet and environment (HUXLEY, SHIELL et al., 2000; VICTORA, ADAIR et al., 2008). In addition, the association of maternal nutrition with later blood pressure is strengthened when adjusted for postnatal growth, weight, height, and body-mass-index-for-age at 2 years (VICTORA, ADAIR et al., 2008).

In animals, a recent review showed accumulating evidence that, to a significant degree, the programmed hypertension may have a developmental origin, and the sympathetic-respiratory dysfunctions play an important role on the development of the maternal diet induced-hypertension (COSTA-SILVA, DE BRITO ALVES et al., 2015; DE BRITO ALVES and COSTA-SILVA 2018). Maternal protein restriction (8% casein) during gestation and lactation induced high respiratory frequency (RF) and respiratory chemosensitivity to O₂/CO₂ (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014). The sympathetic-respiratory overactivity and amplified peripheral chemoreceptor responses were seen in juvenile rats (30 days) submitted

to perinatal protein restriction (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015; DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). Following the observation that sympathetic overactivity is related to the development of hypertension in organisms that suffered perinatal protein malnutrition, the molecular mechanism may include the expression of the inducible hypoxia factor (HIF-1 α) in the carotid body (CB) cells (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015; PRABHAKAR, PENG et al., 2015) and the expression of purinergic receptors (P2X) (RONG, GOURINE et al., 2003; BURNSTOCK 2017). Indeed, increased HIF-1 α expression was previously observed in the heart and brain of protein-restricted animals (ITO, TANABE et al., 2011; ITO, FUNAMOTO et al., 2012). P2X receptors contribute to increased CB activity and its blockade may induce an antihypertensive effect (PIJACKA, MORAES et al., 2016). Our previous study showed that early CB removal normalized RF and sympathetic nervous activity (NOGUEIRA 2018). In addition, the development of the hypertension in offspring was prevented at 30 days of age in those animals submitted to perinatal protein restriction (8% casein) (NOGUEIRA 2018).

Specific “re-programming” interventions, such as physical activity, may mitigate or even prevent maternal protein restriction-programmed metabolic disease (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013). Increasing physical activity is one of the recommendations of the World Health Organization and it is considered a broadly reachable, inexpensive, and effective intervention (LOPEZ-OLMEDO, HERNANDEZ-CORDERO et al., 2016). A meta-analysis included 13 prospective studies and showed an inverse dose–response association between levels of physical activity and risk of hypertension (HUAL, XUN et al., 2013). Maternal exercise reduces blood pressure, systemic vascular resistance, sympathetic activity, plasma renin activity, insulin resistance index, excessive body weight gain and abdominal circumference, and blood lipids (CORNELISSEN and FAGARD 2005; FERRARI and GRAF 2017; MAGRO-MALOSSO, SACCONI et al., 2017; WANG, WEI et al., 2017). Healthy pregnant women without medical contraindications should be encouraged to participate in regular physical activity at least 150 min per week (analogously 20-30 min per day on most or all days of the week) in moderate aerobic intensity (FERRARI and GRAF 2017).

An experimental model of maternal physical activity has been developed to describe physiological adaptations for mother and offspring (SANTANA MUNIZ,

BESERRA et al., 2014; FRAGOSO, LIRA et al., 2017). Pups from rats that were active before and during pregnancy (30min/day, 5 days/week, 4 weeks) showed improved long-term memory in the object recognition task (MARCELINO, DE LEMOS RODRIGUES et al., 2016). Voluntary maternal physical activity (running wheel, 30 days before breeding and during gestation/lactation) has been related to the increased somatic growth and reflex ontogeny of rat offspring during development (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014). Voluntary physical activity on the running wheel before and during gestation/lactation attenuated the effects of a maternal low-protein diet (8% protein) on the patterns of the locomotor activity of offspring rats at 60 days old (FRAGOSO, LIRA et al., 2017). However, less is known about the effects of maternal physical activity on cardiorespiratory parameters and the adaptive effects to attenuate malnutrition-induced long-term hypertension in offspring.

In the present study, we tested the hypothesis that maternal voluntary physical activity before and during gestation prevents respiratory frequency and sympathetic-respiratory overactivities and blocks the afferent inputs from the CB to brainstem acting as new insights on the re-programming of maternal diet induced-hypertension. Thus, the main goal of this study was to evaluate the effects of voluntary maternal physical activity on some parameters of cardiorespiratory and sympathetic systems. In addition, the transcriptional changes of HIF-1 α , TH and P2X receptors in CB peripheral chemoreceptor were analyzed as possible molecular mechanisms.

2. Results

a. Maternal food intake during adaptation, pregnancy and lactation

Descriptive data of food intake during adaptation, pregnancy and lactation are shown in **Figure 1**. During these three periods, the NP-active and LP-active groups showed increased food intake compared to their respective pairs (NP, LP, NP-inactive and LP-inactive).

2.2. Offspring's serum biochemical parameters

The LP group showed a reduction in the serum concentration of total proteins, albumin, triglycerides and cholesterol and an increase in glucose serum concentration compared with the NP group (**Table 3**). Maternal physical activity did not change the biochemical parameters because the NP-active parameters were

similar to those of the NP and NP-inactive groups. However, in the LP and LP-inactive groups, maternal physical activity when categorized as active was able to normalize biochemical parameters, and LP-active pups presented with the same biochemical parameters as the NP-active pups. LP-inactive pups showed no differences in terms of biochemical parameters compared to LP pups.

2.3. Ventilatory parameters

LP pups showed a reduction in the FR from the 1st to 14th day of life (**Figure 2A**) compared with the NP pups. There were no differences when NP-active pups were compared to NP and NP-inactive pups. However, the offspring from active mothers, regardless of nutritional condition, did not present respiratory changes, as the LP-active pups showed ventilatory levels similar to those of the NP-active pups. However, LP pups showed an RF similar to those of the LP-inactive pups (**Figure 2B**). Regarding VT (**Figure 2C and D**) and VE (**Figure 2E and F**), all groups presented the same increased values at 21 days old.

2.4. Cardiovascular parameter

There were no effects of maternal protein restriction and physical activity on hemodynamic parameters in offspring at 30 days old. However, the spectral analysis of the SP in LP and LP-inactive pups showed an increase in the low-frequency oscillation - LF oscillations (**Figure 4A**) when compared with the NP and NP-inactive groups, respectively. The spectral analyses of the NP-active pups were similar to those of NP and NP-inactive pups. However, the LP-active pups showed a reduction of those parameters when compared to NP-active pups. The HF components of arterial pressure showed no differences among groups (**Figure 4B**). The LP and LP-inactive groups showed an increase in the LF/HF ratio (interval pulse), but LP-active pups showed similar results compared with NP-active (**Figure 4C**). In the HR variability evaluated by the symbolic analysis, the percentage of occurrences of the patterns of 0 V and 2 V sequences did not change among groups (**Figure 4D**).

2.5. qRT-PCR

LP and LP-inactive animals showed upregulation of HIF-1 α mRNA (**Figure 4A**) compared with the NP and NP-inactive pups, respectively. The NP-active pups showed similar results to the NP and NP-inactive pups. The LP-active pups showed

similar levels to those of the NP-active pups. Regarding the expression of purinergic receptors P2X2 (**Figure 4B**), P2X3 (**Figure 4C**), P2Y2 (**Figure 4D**) and TH expressions (**Figure 4E**), there were no differences among groups. Neither the diet nor the level of maternal physical activity were able to alter the gene expression.

3. Discussion

Pregnancy requires a significant increase in glucose-stimulated insulin secretion under conditions of normoglycaemia. However, maternal malnutrition is related to the loss of glucose sensitivity and secretory capacity in pancreatic islets, reduced serum proteins such as albumin and prealbumin, total cholesterol and indicators of lipid metabolism (BHARADWAJ, GINOYA et al., 2016; BLESSON, CHINNATHAMBI et al., 2017). In the present study, maternal low-protein diet (8% casein) caused a reduction in the serum concentration of total proteins, albumin, triglycerides and cholesterol and an increase in glycemia. The impairment of biochemical markers of nutritional status and glucose homeostasis may lead to gestational diabetes mellitus and increased risk of chronic diseases later in life (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012). However, maternal physical activity induced a return to normal values of glucose, total proteins, albumin, triglycerides and cholesterol. Our data are aligned with previous studies on the reprogramming effects of maternal physical activity in malnourished rats (LEANDRO, FIDALGO et al., 2012; FIDALGO, FALCAO-TEBAS et al., 2013). Likewise, it was observed an increased food intake-induced maternal physical activity regardless of nutritional condition. These effects are particularly important due to recovery of the loss of metabolic flexibility induced by protein restriction in skeletal muscle because, maternal metabolic dysfunction and impaired fetus growth have been associated with the development of several chronic diseases in adult life (Costa-Silva, de Brito-Alves et al. 2015; de Brito Alves, Toscano et al. 2017).

Respiratory function during development is an important prognostic factor for the course of neurogenic arterial hypertension and the expected lifespan of individuals who suffered perinatal undernutrition (NUYT and ALEXANDER 2009; TAYLOR, SAMUELSSON et al., 2014; COSTA-SILVA, DE BRITO-ALVES et al., 2015). Sympathetic nerve overactivity to the cardiovascular system exhibits noticeable respiratory function-related changes which lead to rhythmic oscillations in arterial blood pressure in young and adult rats submitted to a maternal low-protein

restriction (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015). In the present study, our data showed a reduction in the FR in low-protein restricted pups from the 1st to 14th days of age, and increased VT and VE at 21 days old. Amplified respiratory modulation has been observed in multiple experimental studies of perinatal malnutrition-induced hypertension (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014; BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015; DE BRITO ALVES, DE OLIVEIRA et al., 2016). Male offspring (35 days old) of mothers with uteroplacental insufficiency, induced by bilateral uterine vessel ligation at 18 days of gestation, are also hypertensive later in life (MENUET, WLODEK et al., 2016). Indeed, perinatal malnourished rats display an increased sympathetic and bradycardic response to activation of peripheral chemoreceptors O₂/CO₂ and carotid bodies (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014). Although all respiratory parameters were not different among the groups, we observed an enhanced respiratory function in the rats of active mothers even in the protein-restricted group. The underlying mechanism can be related to increased placental insulin growth factor (IGF-1) and its receptor (IGF-1R) (MANGWIRO, CUFFE et al., 2018) and vascular remodeling-induced exercise in the placenta (KRAMER, BEATTY et al., 2002). These observations add support to the view that maternal physical exercise act positively on the respiratory function of malnourished pups, which represents an important early indication of protection to the development of hypertension.

The spectral analysis of blood pressure and heart rate variability are used to describe rhythmic and nonrhythmic fluctuations of arterial blood pressure providing indexes of autonomic cardiovascular modulation (PARATI, SAUL et al., 1995). In the present study, pups of LP mothers showed an increase in the LF oscillation and LF/HF ratio, but there were no changes in HF oscillation (interval pulse). Increased LF oscillation and reduced cardiovagal influence to the heart are associated with increased risk of cardiovascular diseases, especially hypertension and stroke (HORSMAN, PEEBLES et al., 2015). Rather, we found that pups of active mothers, regardless of diet, showed apparent improvements in spectral analysis that may simply reflect the frequency-dependent nature of the baroreflex (KRAMER, BEATTY et al., 2002). Although these results do not lead to the possible benefits of maternal physical exercise mitigating protein-restriction during the critical period of fetus-placental development, the normalization of sympathetic influence to the

cardiovascular system and BP enhances the notion that physical activity *per se* enhances autonomic cardiovascular control.

The heterodimeric transcription factor HIF-1 α plays an essential role in the maintenance of cellular oxygen homeostasis (SEMENZA 2007). In response to hypoxia, stabilized HIF-1 α proteins initiate the expression of genes that induce autoregulation of vascular flow in peripheral tissues, local tissue perfusion, systemic blood pressure, ventilatory rates and various responses to oxygenation controlled by the carotid body (SEMENZA 2007). In the present study, in response to physiological levels of nutrients, LP-inactive animals showed upregulation of HIF-1 α mRNA at CB. Increased expression of HIF-1 α levels is associated with early response to myocardial ischemia or infarction, and the risk of arterial hypertension (LEE, WOLF et al., 2000; ITO, FUNAMOTO et al., 2012). Accordingly, HIF1 α mRNA increased approximately 1.3-fold in male fetal heart under maternal undernutrition (protein content in low protein food: 8.67% and in normal food: 17.9%) (ITO, TANABE et al., 2011). A recent study showed overexpression of HIF-1 α in the CB of malnourished rats that were 30 days old (DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015). In the study, the expression of purinergic receptors P2X2, P2X3, P2Y2 and TH expressions were not affected by maternal physical activity or diet. In contrast, the expression of the P2X2 receptor was increased by maternal undernutrition (rats deprived of protein throughout pregnancy and 42 d post-parturition) in the submucosal plexus (MISAWA, GIROTTI et al., 2010). Although the purinergic signaling at CB has been implicated in the cardiorespiratory dysfunction in some hypertensive models (PIJACKA, MORAES et al., 2016), no changes were observed in the expression of their main receptors at CB of protein malnourished offspring. The ATP receptors are highly expressed in CB, and they also respond in an exaggerated way when ATP is applied at the site. In addition, the deletion of the ATP receptors reduced the ventilatory response to hypoxia in mice (RONG, GOURINE et al., 2003; LEONARD, SALMAN et al., 2018). This finding suggests that these factors contribute to the increase in CB activity, and its blockade may provide an antihypertensive effect. However, our present study suggests no involvement of purinergic signaling in our model of maternal programming.

In addition to purinergic pathways, adrenergic neurotransmission plays an important role in the modulation of CB activity. Dopamine is the most abundant neurotransmitter in type I cells, and its release is often used as an indicator of

neurosecretion, thereby promoting an increase in CB activity (ZHANG, VOLLMER et al., 2017). The carotid body and sensory and autonomic nerve fibers express tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme of dopamine synthesis (ZHAO, ZHUANG et al., 2016). Some authors have considered that dopamine has an inhibitory effect, as natural stimuli such as hypoxia or acidosis are associated with increased dopamine secretion. Dopamine is a neurotransmitter capable of inhibiting carotid corpuscle activity (NURSE 2014; BIALKOWSKA, ZAJAC et al., 2015). Dopamine infusion is able to decrease RF. Thus, we hypothesized that the malnourished offspring would have a decreased TH expression in CB. However, this hypothesis was not confirmed by our data. In fact, we can suggest that changes in both purinergic and dopaminergic pathways at the CB are not modified by maternal physical activity and protein restriction. Nonetheless, we may establish that all these serum metabolic and cardiorespiratory changes and overexpression of HIF1 α in pups from undernourished mothers were reversed in the pups of active mothers.

Thus, we conclude that maternal physical exercise plays an important role in the prevention of the early appearance of cardiorespiratory dysfunction induced by a low-protein diet during development. The effects included the recovery of the loss of metabolic flexibility, ventilatory function, and the reduction of sympathetic outflow to the cardiovascular system, as well as the normalization of hypoxia inducible factor-1 α at the CB.

4. Material and methods

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of Biological Sciences Center (protocol nº 23076.062778/2014-38), Federal University of Pernambuco, Brazil, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

4.1. Animals

Thirty-six 12-week-old virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the Academic Center of Vitória - CAV, Federal University of Pernambuco, Brazil, and were maintained at a room temperature of 22 ± 1 °C with a controlled light-dark cycle (dark 18.00 pm - 6.00 am). Standard laboratory chow and water were given *ad libitum* during the period of adaptation (AIN-93M) and pregnancy/lactation (AIN-93G), according to the AIN-93 recommendations for

periods of maintenance of laboratory rats. The AIN-93M diet was used, and during for the gestation/lactation period the AIN-93G diet was used (REEVES, NIELSEN et al., 1993). During pregnancy/lactation, dams were fed either a diet 17% casein (normal protein – NP, n=18) or 8% casein (low protein – LP, n=18) *ad libitum*. The nutritional composition of each experimental diet is shown in Table 1.

Food intake was monitored daily (24 hours) during adaptation, pregnancy and lactation. Special cages were built with a stainless steel running wheel and dams were allowed to run for a period of four weeks, as previously described (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014). After the period of adaptation (30 days), females were placed into a standard cage and mated (1 female for 1 male) for a period of 2-4 days. Females had no access to the running wheel during mating. The day in which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception and day 0 of pregnancy. Pregnant rats were transferred to their original cages with free access to the running wheel throughout pregnancy, and up to postnatal day 15 to prevent the pups from running and/or being injured. On postnatal day 1, litters were reduced to 8 pups per dams, ensuring the largest possible number of males. Eventually, litters were completed to 8 pups with 2-3 females if necessary. At weaning on postnatal day 22 to avoid the influence of the estrous cycle of the females, only male pups were used. After weaning, all pups received a standard diet for rodents (52% carbohydrate, 21% protein and 4% lipids, Purina Agriband, Sao Paulo, Brazil) and water *ad libitum*. The control group, NP and LP rats with similar age and body weight were incorporated in the main study and were individually housed in a standard dimension cage without a running wheel apparatus. The litters of eight pups from each dam represent the sample and six groups were formed: NP, LP, NP – inactive (I), LP – I, NP – active (A), LP – A [Table 2]. The evaluation of biochemical parameters was performed at 22 days old, ventilatory parameters were evaluated at 1, 7, 14, 21 and 30 days old; and cardiac parameters and gene expression were evaluated at 30 days old.

4.2. Measurements of voluntary physical activity

Female Wistar rats (initial body weight 220 g) were singly housed into an acrylic cage (cage size: 34 cm height, 27 cm width and 61 cm length) (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014). A stainless steel wheel (27 cm diameter) was placed into the cage for running physical activity with food and water *ad libitum*. A wireless

ciclocomputer (Cataye, model CC-AT200W, Colorado, USA) was attached in the wheel to calculate and display running information, such trip distance (km), trip time (minutes) and estimated calorie burned ($\text{km.s}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Distance and time was determined by counting the number of rotations, which was translated into the number of wheel circumferences passed. Wheel circumference and diameter (measured in millimeters) were used to calibrate the cyclocomputer and then to calculate distance traveled. Calorie burned was estimated by integrating the value calculated from the speed in each second. Measurements of distance traveled, time and calories consumption were daily recorded throughout the experiment. Daily distance traveled, time and estimated calorie burned were used to classify rats in different groups according to voluntary physical activity (inactive and active) according to previous studies (SANTANA MUNIZ, BESERRA et al., 2014; FRAGOSO, LIRA et al., 2017).

4.3. Serum biochemical analyses

Biochemical analyzes were performed at 22 days old. The animals were fasted for 12 hours (7:00 p.m. to 7:00 p.m.), kept in their respective cages, containing water *ad libitum* and, after this period of food deprivation, offspring were anesthetised with xylazine (10 mg/kg, ip.) and ketamine (80 mg/kg, ip.), and blood samples (~1 mL) were collected by plexus retro-orbital disruption. After blood collection, the samples were placed in tubes without anticoagulants and then centrifugation was performed at 3500 g for 10 minutes to obtain the serum. The supernatant was removed, transferred to an Eppendorf tube and stored at -20 °C, which was then sent to perform the biochemical analyzes of total protein, albumin, triglyceride, total cholesterol and fasting glucose using respective commercial kits and following recommendations and procedures determined by the manufacturer company (Labtest Diagnostica, MG, Brazil).

4.4. Respiratory recordings and analyzes

Respiratory frequency (RF), tidal volume (VT) and ventilation (VE) were performed using the whole body plethysmography method (MALAN 1973). According the rats' age were placed into a plexiglas chamber of 212 mL (1 and 7 postnatal day), 700 mL (14 postnatal day) or 5 L (21 and 30 postnatal day). The animals were maintained for a period of acclimatization (~10 a 60 min) and the chamber was

flushed with humidified air and maintained at 25°C. After the rats had been acclimatized, their ventilatory parameters were recorded as the airflow to the chamber was suspended for short periods (~2 min), and the pressure oscillations caused by breathing were captured by a pressure differential transducer connected to a signal amplifier (ML141 Spirometer, PowerLab; ADInstruments®). The signals were then captured by an acquisition system and data analysis was performed (PowerLab; ADInstruments®). All of the data were analyzed off-line with the use of appropriate software (LabChart 7 Pro; ADInstruments®). Tidal volume (VT) and respiratory frequency (RF) were calculated as described by Malan (1973) (MALAN 1973), and ventilation (VE) was obtained as the product of VT and RF. These parameters were calculated using a period of 10s of respiratory recordings in conscious rats when they were quiet and presenting no body movements. The data recorded when the rats were moving inside the chamber were excluded from analysis because the respiratory activity was contaminated by larger oscillations in the pressure inside the chamber. The rats were weighed on the day of recordings to determine the body weight, which was used to correct the ventilation index for each animal.

4.5. Cardiovascular recordings

Thirty postnatal day, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg.kg⁻¹) and xylazine (10 mg.kg⁻¹), and the femoral artery PE-50 was connected to PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). The catheter were filled with heparinized saline (NaCl 0.9% + heparine 0.05%), tunnelled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. After surgery, the animals received injection of ketoprofen (5 mg.kg⁻¹ i.p.) and a period of 18-24 hours (sufficient recovery time for this surgical procedure, as previously described by Nogueira (2018)). Mean arterial pressure (MAP), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) were recorded in unanesthetized freely-moving animals by connecting the arterial catheter to a pressure transducer. The signals were amplified (ML866/P, ADInstruments®, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), sampled at 2 kHz, digitalized (Power Lab, model 4/30, ADInstruments®) and recorded using appropriate software (LabChart7 Pro, ADInstruments®). Recordings of baseline pulsatile arterial pressure (PAP), MAP and HR were performed for 60 min. The cardiovascular autonomic evaluation was performed using the frequency domain analysis of the

systolic arterial pressure (SAP) by an appropriate software program (version 2.4, available at <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>) (BARROS, DE BRITO ALVES et al., 2015). The power of the oscillatory components obtained from rats of the NP and LP groups was quantified into two frequency bands: low-frequency (LF: 0.20-0.75 Hz), representative of the modulatory effects of sympathetic activity controlling vascular tonus and heart activity; and high frequency (HF: 0.75-3.0 Hz), associated to a respiratory or parasympathetic modulation of heart rate and arterial pressure (MALLIANI, PAGANI et al., 1991; BERNARDI, PORTA et al., 2001). To assess the sympathovagal index to the heart, the LF/HF ratio of the IP variability was calculated. Moreover, the symbolic analysis was used, a non-linear method based on the conversion of the series into a sequence of symbols (PORTA, TOBALDINI et al., 2007; TEZINI, DIAS et al., 2013).

4.6. Sample for qRT-PCR

A group of offspring (n=30) at 30 days old, free of any experimental procedure, was separated for analysis of gene expression. The animals fasted for 6 hours and were then euthanized. Immediately after an incision was made at the height of the trachea, in the isolate carotid artery and sectioned at its bifurcation, with the intention of collecting the CB. The sample was frozen rapidly and stored at -80 °C.

4.7. Quantitation of genes transcribed by qRT-PCR

The expression levels of HIF-1 α , P2X2, P2X3, P2Y2 and TH were evaluated by real-time quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR). Total RNA was extracted from CB tissues with a miRNeasy Mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. We used RNA extraction with TRIzol™ (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA 92008, EUA), according to the manufacturer's instructions. Samples were treated with DNase™ (USB) and quantified in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). The primer sequences used in this study are reported in **Table 4**. Reactions were performed in a 96-well plate (20 μ L reaction per well) using a QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen®, Hilden, Germany) for one-step quantitative RT-PCR, according to the manufacturer's instructions. Each RNA sample was normalized to 100ng, and reactions were prepared containing SYBR green master mix, reverse transcriptase, forward/reverse primers (0.2 μ M each) for the

target and the endogenous control genes (0.1 μ M each). qRT-PCR for each sample was performed in duplicate. Reactions were incubated at 50°C for 30 min to allow reverse transcription; 95°C for 15 min, to activate Taq; and 40 cycles of denaturation (94°C for 15 s), annealing (60°C for 30 s) and elongation (72°C for 30 s). qPCR results from each gene (including the housekeeping gene) were performed using an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA). Relative quantification analyses were performed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and derived from a reference sample (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Gene expression data were normalized using β -actin as the housekeeping gene, using the 7500 software version 2.0.4 (Applied Biosystems®).

4.8. Statistical analyses

Measurements of biochemical, ventilation, blood pressure and gene expression are presented as means $\pm$ S.E.M. The NP and LP group were compared using the unpaired Student t-test, the effects of physical activity were compared using the ANOVA two-way test, followed by the Bonferroni post hoc. Differences between groups with p values of <0.05 were considered significant. GraphPad Prism 5.0® software was used to perform the analysis.

5. Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6. Funding

V.O.N., L.D.S.A., R.L.R.J. and P.E.D.M. contributed to experiments with conscious rats. V.O.N., L.D.S.A., R.L.R.J., P.E.D.M., D.A.F.F., C.G.L and J.H.C.S. contributed to the conception and experimental design, data analyses and interpretation of the findings and the preparation of this manuscript. All authors read and approved the manuscript.

7. Financial Support

We thank both Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco-PE-Brazil (grant nº APQ 1365-2.07/10; PRONEM 0797-4.05/14; APQ 1312-4.05/15) and

the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (grant nº 484452/2011-8; 478640/2013-7; 459341/2014-6) for financial support. We also thank the Technological Platform Center of FIOCRUZ-PE for the availability of space and equipment for molecular biology experiments.

Reference

- ABDALA, A. P., MCBRYDE, F. D., et al.,. "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat." **J Physiol** 590(17): 4269-4277. (2012)
- ABDULQAWI, R., DOCKRY, R., et al.,. "P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study." **Lancet** 385(9974): 1198-1205. (2015)
- AGARWAL, K. N., PRASAD, C., et al.,. "Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats." **Ann Nutr Metab** 25(4): 228-233. (1981)
- ANDERSEN, L. G., ANGQUIST, L., et al.,. "Birth weight in relation to leisure time physical activity in adolescence and adulthood: meta-analysis of results from 13 nordic cohorts." **PLoS ONE** 4(12): e8192. (2009)
- BARKER, D. J. "The origins of the developmental origins theory." **J Intern Med** 261(5): 412-417. (2007)
- BARKER, D. J., OSMOND, C., et al.,. "Trajectories of growth among children who have coronary events as adults." **N Engl J Med** 353(17): 1802-1809. (2005)
- BARKER, D. J. and THORNBURG, K. L. "Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review." **Placenta** 34(10): 841-845. (2013)
- BARKER, D. J., WINTER, P. D., et al.,. "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease." **Lancet** 2(8663): 577-580. (1989)
- BARROS, M. A., DE BRITO ALVES, J. L., et al.,. "Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring." **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 25(1): 123-130. (2015)
- BARROS, R. C., BONAGAMBA, L. G., et al.,. "Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats." **Auton Neurosci** 97(2): 110-115. (2002)
- BAYBUTT, R. C. and MOLTENI, A. "Vitamin A and emphysema." **Vitam Horm** 75: 385-401. (2007)
- BEEVERS, C. S., LI, F., et al.,. "Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells." **Int J Cancer** 119(4): 757-764. (2006)
- BELL, J. M. and SLOTKIN, T. A. "Postnatal nutritional status influences development of cardiac adrenergic receptor binding sites." **Brain Res Bull** 21(6): 893-896. (1988)
- BENABE, J. E., WANG, S., et al.,. "Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding." **Am J Physiol** 265(5 Pt 2): F660-669. (1993)
- BERARDI, N., PIZZORUSSO, T., et al.,. "Molecular basis of plasticity in the visual cortex." **Trends Neurosci** 26(7): 369-378. (2003)
- BERNARDI, L., PORTA, C., et al.,. "Modulatory effects of respiration." **Auton Neurosci** 90(1-2): 47-56. (2001)
- BHARADWAJ, S., GINOYA, S., et al.,. "Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment." **Gastroenterol Rep (Oxf)** 4(4): 272-280. (2016)
- BIALKOWSKA, M., ZAJAC, D., et al.,. "Inhibition of peripheral dopamine metabolism and the ventilatory response to hypoxia in the rat." **Adv Exp Med Biol** 837: 9-17. (2015)
- BIOSCA, M., RODRIGUEZ, G., et al.,. "Central adiposity in children born small and large for gestational age." **Nutr Hosp** 26(5): 971-976. (2011)

- BLESSON, C. S., CHINNATHAMBI, V., et al.,. "Gestational Protein Restriction Impairs Glucose Disposal in the Gastrocnemius Muscles of Female Rats." **Endocrinology** 158(4): 756-767. (2017)
- BOGDARINA, I., WELHAM, S., et al.,. "Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension." **Circ Res** 100(4): 520-526. (2007)
- BURNSTOCK, G. "Purinergic Signalling: Therapeutic Developments." **Front Pharmacol** 8: 661. (2017)
- CARROLL, J. L. "Developmental plasticity in respiratory control." **J Appl Physiol** (1985) 94(1): 375-389. (2003)
- CHASE, H. P., DORSEY, J., et al.,. "The effect of malnutrition on the synthesis of a myelin lipid." **Pediatrics** 40(4): 551-559. (1967)
- CLAPP, J. F., 3RD. "The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth." **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 110 Suppl 1: S80-85. (2003)
- CLAPP, J. F., 3RD. "Long-term outcome after exercising throughout pregnancy: fitness and cardiovascular risk." **Am J Obstet Gynecol** 199(5): 489 e481-486. (2008)
- COMROE, J. "The location and function of the chemoreceptors of the aorta." **Am J Physiol** 127: 176-191. (1939)
- CORNELISSEN, V. A. and FAGARD, R. H. "Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials." **J Hypertens** 23(2): 251-259. (2005)
- COSTA-SILVA, J. H., DE BRITO-ALVES, J. L., et al.,. "New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity." **Front Physiol** 6: 345. (2015)
- COSTA-SILVA, J. H., SILVA, P. A., et al.,. "Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood?" **Eur J Nutr** 48(7): 437-445. (2009)
- DALY, M. and UNGAR, A. "Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog." **J Physiol** 182(2): 379-403. (1966)
- DALY, M. D., ANGELL-JAMES, J. E., et al.,. "Role of carotid-body chemoreceptors and their reflex interactions in bradycardia and cardiac arrest." **Lancet** 1(8119): 764-767. (1979)
- DALYMDE, B., HAZZLEDINE, J. L., et al.,. "Reflex Respiratory and Peripheral Vascular Responses to Stimulation of the Isolated Perfused Aortic Arch Chemoreceptors of the Dog." **J Physiol** 177: 300-322. (1965)
- DAUNCEY, M. J. and BICKNELL, R. J. "Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life." **Nutr Res Rev** 12(2): 231-253. (1999)
- DE BRITO ALVES, J. L. and COSTA-SILVA, J. H. "Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms." **Clin Exp Pharmacol Physiol** 45(5): 422-429. (2018)
- DE BRITO ALVES, J. L., DE OLIVEIRA, J. M., et al.,. "Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata." **Clin Exp Pharmacol Physiol**. (2016)
- DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V. O., et al.,. "Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring." **J Nutr** 145(5): 907-914. (2015)
- DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V. O., et al.,. "Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring." **Br J Nutr** 111(4): 606-615. (2014)
- DE BRITO ALVES, J. L., NOGUEIRA, V. O., COSTA-SILVA, J. H. "Effects of maternal protein restriction on sympathetic-respiratory activities, O₂ chemosensitivity and HIF-1 α expression in male rat offspring." **I Congresso PanAmericano de Fisiologia**. (2014)
- DE MELO MONTENEGRO, I. H., MOITA, L., et al.,. "Effects of a Moderate Physical Training on the Leptin Synthesis by Adipose Tissue of Adult Rats Submitted to a Perinatal Low-protein Diet." **Horm Metab Res** 44(11): 814-818. (2012)

- EASTON, J. and HOWE, A. "The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat." **Cell Tissue Res** 232(2): 349-356. (1983)
- ERICKSON, J. T. and MILLHORN, D. E. "Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats." **Brain Res** 567(1): 11-24. (1991)
- FALCAO-TEBAS, F., BENTO-SANTOS, A., et al.,. "Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats." **Br J Nutr** 107(3): 372-377. (2012)
- FERRARI, N. and GRAF, C. "[Recommendations for Physical Activity During and After Pregnancy]." **Gesundheitswesen** 79(S 01): S36-S39. (2017)
- FIDALGO, M., FALCAO-TEBAS, F., et al.,. "Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training." **Br J Nutr** 109(3): 449-456. (2013)
- FIDONE, S. and GONZALEZ, C. "Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro." **J Physiol** 333: 69-79. (1982)
- FORD, A. P. and UNDEM, B. J. "The therapeutic promise of ATP antagonism at P2X3 receptors in respiratory and urological disorders." **Front Cell Neurosci** 7: 267. (2013)
- FORD, A. P., UNDEM, B. J., et al.,. "P2X3 receptors and sensitization of autonomic reflexes." **Auton Neurosci** 191: 16-24. (2015)
- FRAGOSO, J., LIRA, A. O., et al.,. "Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats." **Exp Physiol** 102(11): 1486-1499. (2017)
- FRAGOSO, J., LIRA, A. O., et al.,. "Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats." **Exp Physiol**. (2017)
- FRANCHINI, K. G. and KRIEGER, E. M. "Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN." **J Auton Nerv Syst** 42(1): 63-69. (1993)
- FRANCO, M. C., CASARINI, D. E., et al.,. "Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight?" **Clin Sci (Lond)** 114(5): 375-380. (2008)
- GONZALEZ, C., ALMARAZ, L., et al.,. "Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges." **Physiol Rev** 74(4): 829-898. (1994)
- GOYAL, R., GOYAL, D., et al.,. "Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy." **Reprod Sci** 17(3): 227-238. (2010)
- GUYTON, A. "Regulação Nervosa da Circulação e Controle Rápido da Pressão Arterial." **Tratado de Fisiologia Médica** 8ª Edição: 170-179. (1992))
- HANSON, M. and GLUCKMAN, P. "Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications." **Am J Clin Nutr** 94(6 Suppl): 1754S-1758S. (2011)
- HAY, N. and SONENBERG, N. "Upstream and downstream of mTOR." **Genes Dev** 18(16): 1926-1945. (2004)
- HEYMANS, C. J. F. "The part played by vascular pressure and chemoreceptor in respiratory control." **Nobel Lectures - Physiology or Medicine (1922-1941). Amsterdam: Elsevier**: 460-481. (1965)
- HEYMANS, J. H. C. "Sur les modifications directes et sur la régulation réflexe de l'activité du centre respiratoire de la tête isolée du chien." **Arch Int Pharmacodyn** 33: 273-372. (1927)
- HORSMAN, H. M., PEEBLES, K. C., et al.,. "Interactions between breathing rate and low-frequency fluctuations in blood pressure and cardiac intervals." **J Appl Physiol** (1985) 119(7): 793-798. (2015)
- HOWE, A., MORGAN, M., et al.,. "A comparison of the ultrastructure of the abdominal vagal paraganglia and similar tissues in the rat [proceedings]." **J Physiol** 275: 34P-35P. (1978)
- HROLFSDOTTIR, L., HALLDORSSON, T. I., et al.,. "Maternal Macronutrient Intake and Offspring Blood Pressure 20 Years Later." **J Am Heart Assoc** 6(4). (2017)
- HUAI, P., XUN, H., et al.,. "Physical activity and risk of hypertension: a meta-analysis of prospective cohort studies." **Hypertension** 62(6): 1021-1026. (2013)

- HUANG, Y., HICKEY, R. P., et al.,. "Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart." **FASEB J** 18(10): 1138-1140. (2004)
- HUXLEY, R. R., SHIELL, A. W., et al.,. "The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature." **J Hypertens** 18(7): 815-831. (2000)
- ITO, T., FUNAMOTO, K., et al.,. "Maternal undernutrition induces the expression of hypoxia-related genes in the fetal brain." **Tohoku J Exp Med** 226(1): 37-44. (2012)
- ITO, T., TANABE, K., et al.,. "Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1 α in the fetal heart is associated with maternal undernutrition." **Tohoku J Exp Med** 224(3): 163-171. (2011)
- ITO, Y., AHMAD, A., et al.,. "Hypoxia-inducible factor regulates expression of surfactant protein in alveolar type II cells in vitro." **Am J Respir Cell Mol Biol** 45(5): 938-945. (2011)
- JONES, J. E., JURGENS, J. A., et al.,. "Mechanisms of fetal programming in hypertension." **Int J Pediatr** 2012: 584831. (2012)
- JORDAN, D. and SPYER, K. M. "Studies on the termination of sinus nerve afferents." **Pflugers Arch** 369(1): 65-73. (1977)
- KRAMER, J. M., BEATTY, J. A., et al.,. "Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity." **Clin Exp Pharmacol Physiol** 29(1-2): 122-126. (2002)
- LABAYEN, I., MORENO, L. A., et al.,. "Early programming of body composition and fat distribution in adolescents." **J Nutr** 136(1): 147-152. (2006)
- LAHIRI, S., ROY, A., et al.,. "Oxygen sensing in the body." **Prog Biophys Mol Biol** 91(3): 249-286. (2006)
- LANDSBERG, L., ARONNE, L. J., et al.,. "Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension." **J Clin Hypertens (Greenwich)** 15(1): 14-33. (2013)
- LEANDRO, C. G., FIDALGO, M., et al.,. "Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus." **J Biomed Biotechnol** 2012: 805418. (2012)
- LEE, S. H., WOLF, P. L., et al.,. "Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction." **N Engl J Med** 342(9): 626-633. (2000)
- LEONARD, E. M., SALMAN, S., et al.,. "Sensory Processing and Integration at the Carotid Body Tripartite Synapse: Neurotransmitter Functions and Effects of Chronic Hypoxia." **Front Physiol** 9(225). (2018)
- LIM, C. S., KIRIAKIDIS, S., et al.,. "Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall." **J Vasc Surg** 58(1): 219-230. (2013)
- LIU, L., XU, X., et al.,. "Increase in the prevalence of hypertension among adults exposed to the Great Chinese Famine during early life." **Environ Health Prev Med** 22(1): 64. (2017)
- LOEWY, A. D. and BURTON, H. "Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat." **J Comp Neurol** 181(2): 421-449. (1978)
- LOPEZ-OLMEDO, N., HERNANDEZ-CORDERO, S., et al.,. "The Associations of Maternal Weight Change with Breastfeeding, Diet and Physical Activity During the Postpartum Period." **Matern Child Health J** 20(2): 270-280. (2016)
- LORITE MINGOT, D., GESTEIRO, E., et al.,. "Epigenetic effects of the pregnancy Mediterranean diet adherence on the offspring metabolic syndrome markers." **J Physiol Biochem** 73(4): 495-510. (2017)
- LUGLIANI, R., WHIPP, B. J., et al.,. "A role for the carotid body in cardiovascular control in man." **Chest** 63(5): 744-750. (1973)
- LUZARDO, R., SILVA, P. A., et al.,. "Metabolic programming during lactation stimulates renal Na⁺ transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways." **PLoS One** 6(7): e21232. (2011)

- MAGRO-MALOSSO, E. R., SACCONI, G., et al., "Exercise during pregnancy and risk of gestational hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis." **Acta Obstet Gynecol Scand** 96(8): 921-931. (2017)
- MAJUMDER, P. K., FEBBO, P. G., et al., "mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways." **Nat Med** 10(6): 594-601. (2004)
- MALAN, A. "Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms." **Respir Physiol** 17(1): 32-44. (1973)
- MALLIANI, A., PAGANI, M., et al., "Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain." **Circulation** 84(2): 482-492. (1991)
- MALOYAN, A., ELI-BERCHOER, L., et al., "HIF-1 α -targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart." **Physiol Genomics** 23(1): 79-88. (2005)
- MALPAS, S. C. "The rhythmicity of sympathetic nerve activity." **Prog Neurobiol** 56(1): 65-96. (1998)
- MANGWIRO, Y. T. M., CUFFE, J. S. M., et al., "Maternal exercise in rats upregulates the placental insulin-like growth factor system with diet- and sex-specific responses: minimal effects in mothers born growth restricted." **J Physiol**. (2018)
- MARCELINO, T. B., DE LEMOS RODRIGUES, P. I., et al., "Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring." **Behav Brain Res** 312: 30-38. (2016)
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., et al., "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." **Braz J Biol** 62(4A): 609-614. (2002)
- MARSHALL, J. M. "Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation." **Physiol Rev** 74(3): 543-594. (1994)
- MARTIN-GRONERT, M. S. and OZANNE, S. E. "Experimental IUGR and later diabetes." **J Intern Med** 261(5): 437-452. (2007)
- MCBRYDE, F. D., ABDALA, A. P., et al., "The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension." **Nat Commun** 4: 2395. (2013)
- MCGOWAN, S. E. "Vitamin A deficiency increases airway resistance following C-fiber stimulation." **Respir Physiol Neurobiol** 157(2-3): 281-289. (2007)
- MCGOWAN, S. E., TAKLE, E. J., et al., "Vitamin A deficiency alters the pulmonary parenchymal elastic modulus and elastic fiber concentration in rats." **Respir Res** 6: 77. (2005)
- MCKITRICK, D. J., KRUKOFF, T. L., et al., "Expression of c-fos protein in rat brain after electrical stimulation of the aortic depressor nerve." **Brain Res** 599(2): 215-222. (1992)
- MENUET, C., WLODEK, M. E., et al., "Respiratory modulation of sympathetic nerve activity is enhanced in male rat offspring following uteroplacental insufficiency." **Respir Physiol Neurobiol** 226: 147-151. (2016)
- MISAWA, R., GIROTTI, P. A., et al., "Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons." **World J Gastroenterol** 16(29): 3651-3663. (2010)
- MORAES, D. J., MACHADO, B. H., et al., "Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy contributing to neurogenic hypertension." **J Physiol** 593(14): 3055-3063. (2015)
- NAKAYAMA, K. "Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma." **Dis Chest** 40: 595-604. (1961)
- NOGUEIRA, V., BRITO-ALVES, J., et al., "Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers." **Hypertens Res**. (2018)
- NOGUEIRA, V. O., BRITO-ALVES, J., FONTES, D., OLIVEIRA, L., LUCCA JUNIOR, W., TOURNEUR, Y., WANDERLEY, A., DA SILVA, G. F., LEANDRO, C., COSTA-SILVA, J. "Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers." **Hypertension research**. (2018)
- NURSE, C. A. "Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors." **J Physiol** 592(16): 3419-3426. (2014)

- NUYT, A. M. and ALEXANDER, B. T. "Developmental programming and hypertension." **Curr Opin Nephrol Hypertens** 18(2): 144-152. (2009)
- NWAGWU, M. O., COOK, A., et al.,. "Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero." **Br J Nutr** 83(1): 79-85. (2000)
- PAIXAO, A. D., MACIEL, C. R., et al.,. "Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age." **Biol Neonate** 80(3): 239-246. (2001)
- PALKOVITS, M. and ZABORSZKY, L. "Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc." **Prog Brain Res** 47: 9-34. (1977)
- PALLOT, D. J. "The mammalian carotid body." **Adv Anat Embryol Cell Biol** 102: 1-91. (1987)
- PARATI, G., SAUL, J. P., et al.,. "Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal." **Hypertension** 25(6): 1276-1286. (1995)
- PATON, J. F., SOBOTKA, P. A., et al.,. "The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases." **Hypertension** 61(1): 5-13. (2013)
- PAULINO-SILVA, K. M. and COSTA-SILVA, J. H. "Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction." **Clin Exp Pharmacol Physiol.** (2016)
- PEDROSA, M. L. and MORAES-SANTOS, T. "Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats." **Braz J Med Biol Res** 20(3-4): 331-338. (1987)
- PIJACKA, W., MORAES, D. J., et al.,. "Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension." **Nat Med** 22(10): 1151-1159. (2016)
- PISKURIC, N. A., ZHANG, M., et al.,. "Potential roles of ATP and local neurons in the monitoring of blood O₂ content by rat aortic bodies." **Exp Physiol** 99(1): 248-261. (2014)
- PORTA, A., TOBALDINI, E., et al.,. "Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293(1): H702-708. (2007)
- PRABHAKAR, N. R. "Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics." **J Physiol** 591(Pt 9): 2245-2257. (2013)
- PRABHAKAR, N. R. and PEERS, C. "Gasotransmitter regulation of ion channels: a key step in O₂ sensing by the carotid body." **Physiology (Bethesda)** 29(1): 49-57. (2014)
- PRABHAKAR, N. R., PENG, Y. J., et al.,. "Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia." **Compr Physiol** 5(2): 561-577. (2015)
- PRABHAKAR, N. R. and SEMENZA, G. L. "Oxygen Sensing and Homeostasis." **Physiology (Bethesda)** 30(5): 340-348. (2015)
- PRASAD, M., FEARON, I. M., et al.,. "Expression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling." **J Physiol** 537(Pt 3): 667-677. (2001)
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., et al.,. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." **J Nutr** 123(11): 1939-1951. (1993)
- REHAN, V. K., SAKURAI, R., et al.,. "Effects of maternal food restriction on offspring lung extracellular matrix deposition and long term pulmonary function in an experimental rat model." **Pediatr Pulmonol** 47(2): 162-171. (2012)
- RIGUAL, R., LOPEZ-LOPEZ, J. R., et al.,. "Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high PCO₂ stimulation of the cat carotid body." **J Physiol** 433: 519-531. (1991)
- RONG, W., GOURINE, A. V., et al.,. "Pivotal role of nucleotide P2X₂ receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia." **J Neurosci** 23(36): 11315-11321. (2003)

- SANTANA MUNIZ, G., BESERRA, R., et al.,. "Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny." **Physiol Behav** 129: 1-10. (2014)
- SCHULTZ, H. D., MARCUS, N. J., et al.,. "Mechanisms of carotid body chemoreflex dysfunction during heart failure." **Exp Physiol** 100(2): 124-129. (2015)
- SEMENZA, G. L. "Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1." **Biochem J** 405(1): 1-9. (2007)
- SHAW, K., MONTAGUE, W., et al.,. "Biochemical studies on the release of catecholamines from the rat carotid body in vitro." **Biochim Biophys Acta** 1013(1): 42-46. (1989)
- SIMMS, A. E., PATON, J. F., et al.,. "Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?" **J Physiol** 587(Pt 3): 597-610. (2009)
- SNOECK, A., REMACLE, C., et al.,. "Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas." **Biol Neonate** 57(2): 107-118. (1990)
- SZOSTAK-WEGIEREK, D. "Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health." **Int J Womens Health** 6: 647-656. (2014)
- TAN, Z. Y., LU, Y., et al.,. "Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR." **Circ Res** 106(3): 536-545. (2010)
- TARRY-ADKINS, J. L. and OZANNE, S. E. "Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions." **Am J Clin Nutr** 94(6 Suppl): 1765S-1771S. (2011)
- TAYLOR, P. D., SAMUELSSON, A. M., et al.,. "Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin." **Acta Physiol (Oxf)** 210(3): 508-523. (2014)
- TEZINI, G. C., DIAS, D. P., et al.,. "Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause." **Exp Gerontol** 48(2): 147-153. (2013)
- TOLLE, A., SCHLAME, M., et al.,. "Vitamin E differentially regulates the expression of peroxiredoxin-1 and -6 in alveolar type II cells." **Free Radic Biol Med** 38(10): 1401-1408. (2005)
- TONKISS, J., TRZCINSKA, M., et al.,. "Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry." **Hypertension** 32(1): 108-114. (1998)
- URENA, J., FERNANDEZ-CHACON, R., et al.,. "Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(21): 10208-10211. (1994)
- VAAG, A. A., GRUNNET, L. G., et al.,. "The thrifty phenotype hypothesis revisited." **Diabetologia** 55(8): 2085-2088. (2012)
- VAN ABELEN, A. F., VEENENDAAL, M. V., et al.,. "The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition." **J Hypertens** 30(12): 2255-2267. (2012)
- VICTORA, C. G., ADAIR, L., et al.,. "Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital." **Lancet** 371(9609): 340-357. (2008)
- WANG, C., WEI, Y., et al.,. "A randomized clinical trial of exercise during pregnancy to prevent gestational diabetes mellitus and improve pregnancy outcome in overweight and obese pregnant women." **Am J Obstet Gynecol** 216(4): 340-351. (2017)
- WANG, Z. Z., STENSAAS, L. J., et al.,. "The co-existence of biogenic amines and neuropeptides in the type I cells of the cat carotid body." **Neuroscience** 47(2): 473-480. (1992)
- WELLS, J. C. "Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities." **Am J Hum Biol** 22(1): 1-17. (2010)
- WEST-EBERHARD, M. J. "Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity." **J Exp Zool B Mol Dev Evol** 304(6): 610-618. (2005)
- WILLIAMS, B. "Vascular ageing and interventions: lessons and learnings." **Ther Adv Cardiovasc Dis** 10(3): 126-132. (2016)

- WOLFE, L. A. and WEISSGERBER, T. L. "Clinical physiology of exercise in pregnancy: a literature review." **J Obstet Gynaecol Can** 25(6): 473-483. (2003)
- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., et al.,. "TOR signaling in growth and metabolism." **Cell** 124(3): 471-484. (2006)
- YAMAOKA, S., KIM, H. S., et al.,. "Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation." **Free Radic Res** 42(6): 602-612. (2008)
- YUAN, G., VASAVDA, C., et al.,. "Protein kinase G-regulated production of H₂S governs oxygen sensing." **Sci Signal** 8(373): ra37. (2015)
- ZAPATA, P. "Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors?" **Respir Physiol Neurobiol** 157(1): 106-115. (2007)
- ZHANG, M., PISKURIC, N. A., et al.,. "P2Y₂ receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP." **J Physiol** 590(17): 4335-4350. (2012)
- ZHANG, M., VOLLMER, C., et al.,. "Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current I_h in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture." **J Physiol** 12(10). (2017)
- ZHAO, L., ZHUANG, J., et al.,. "From the Cover: Prenatal Nicotinic Exposure Attenuates Respiratory Chemoreflexes Associated With Downregulation of Tyrosine Hydroxylase and Neurokinin 1 Receptor in Rat Pup Carotid Body." **Toxicol Sci** 153(1): 103-111. (2016)
- ZHENG, X., WANG, Y., et al.,. "Risk of metabolic syndrome in adults exposed to the great Chinese famine during the fetal life and early childhood." **Eur J Clin Nutr** 66(2): 231-236. (2012)
- ZOCCAL, D. B., BONAGAMBA, L. G., et al.,. "Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction." **Exp Physiol** 94(9): 972-983. (2009)
- ZOCCAL, D. B., SIMMS, A. E., et al.,. "Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity." **J Physiol** 586(13): 3253-3265. (2008)

Figures and Legend

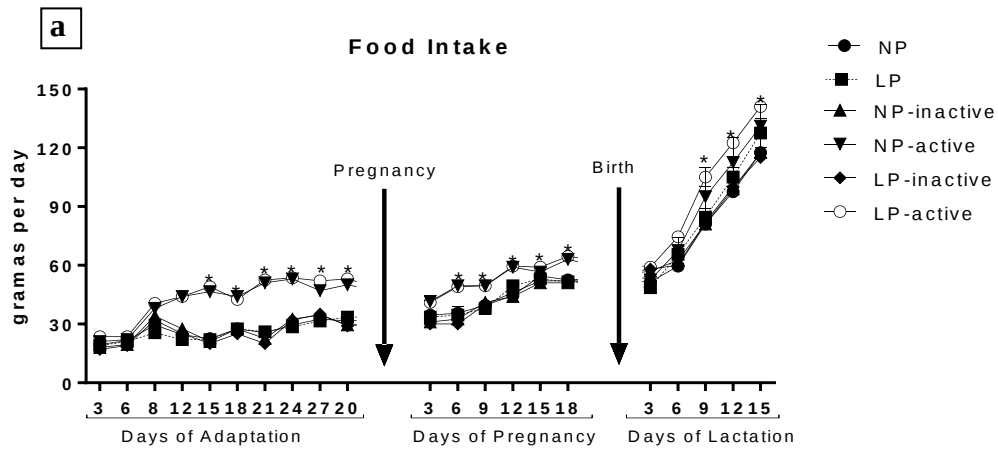


Figure 1. Food Intake during 30 days of adaptation, pregnancy and lactation. During adaptation and pregnancy periods, groups were constituted by NP (n=6), LP (n=6), NP-inactive (n=6), NP-active (n=6), LP-inactive (n=6) and LP-active (n=6). The values are presented as the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ using two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

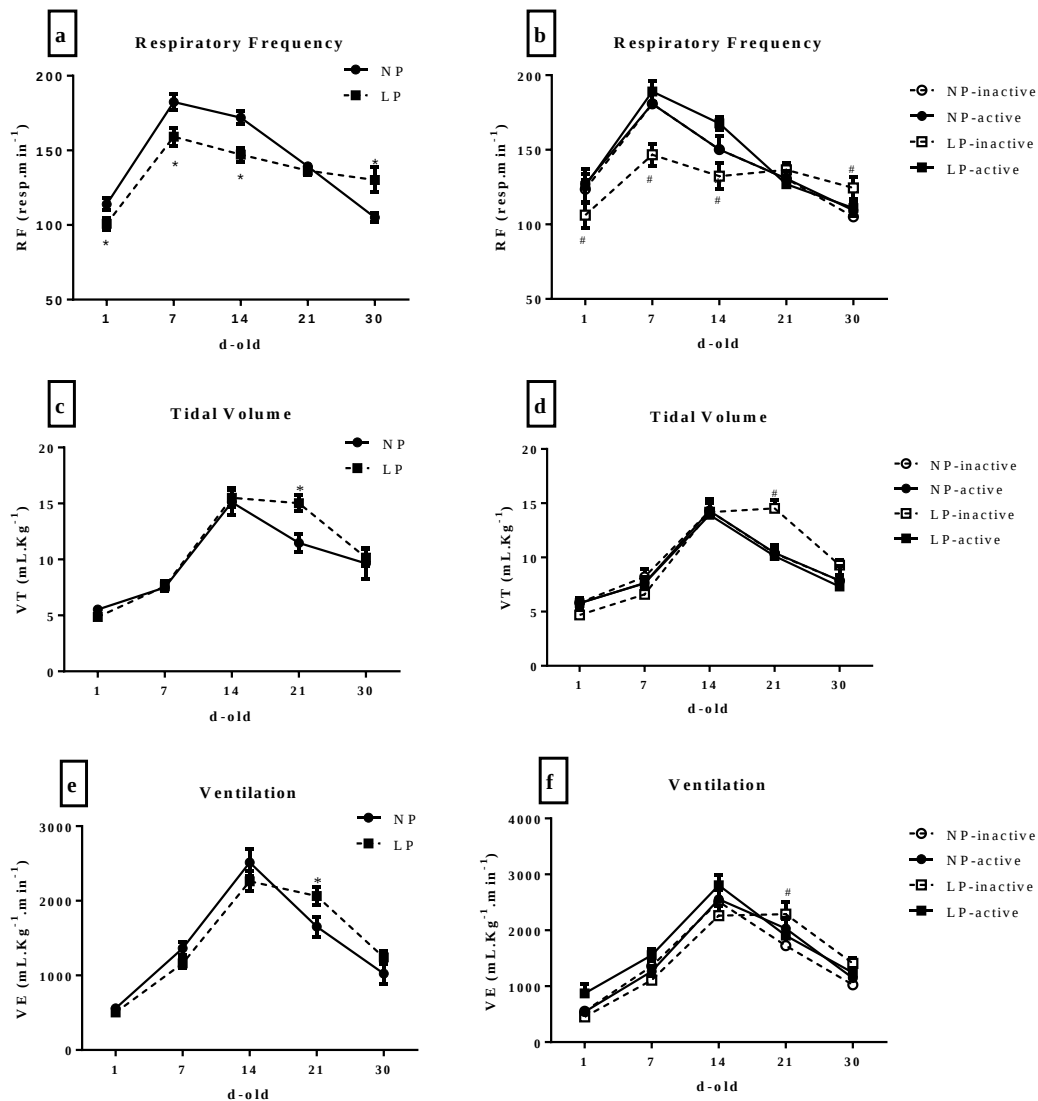


Figure 2. Ventilatory parameters (respiratory frequency - FR, tidal volume - VT and ventilation - VE) of offspring of rats at 1, 7, 14, 21 and 30 days old. The groups included NP (n=8), LP (n=8), NP-inactive (n=8), NP-active (n=8), LP-inactive (n=8) and LP-active (n=8). A, C and E show the ventilatory parameters of rats that did not have physical activity (NP and LP groups); B, D and F show the parameters in the inactive and active groups. Values are presented as the mean $\pm$ S.E.M. *Mean values were significantly different from those of the NP group ($p < 0.05$; unpaired Student's test). #Mean values were significantly different after intragroup analysis (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test).

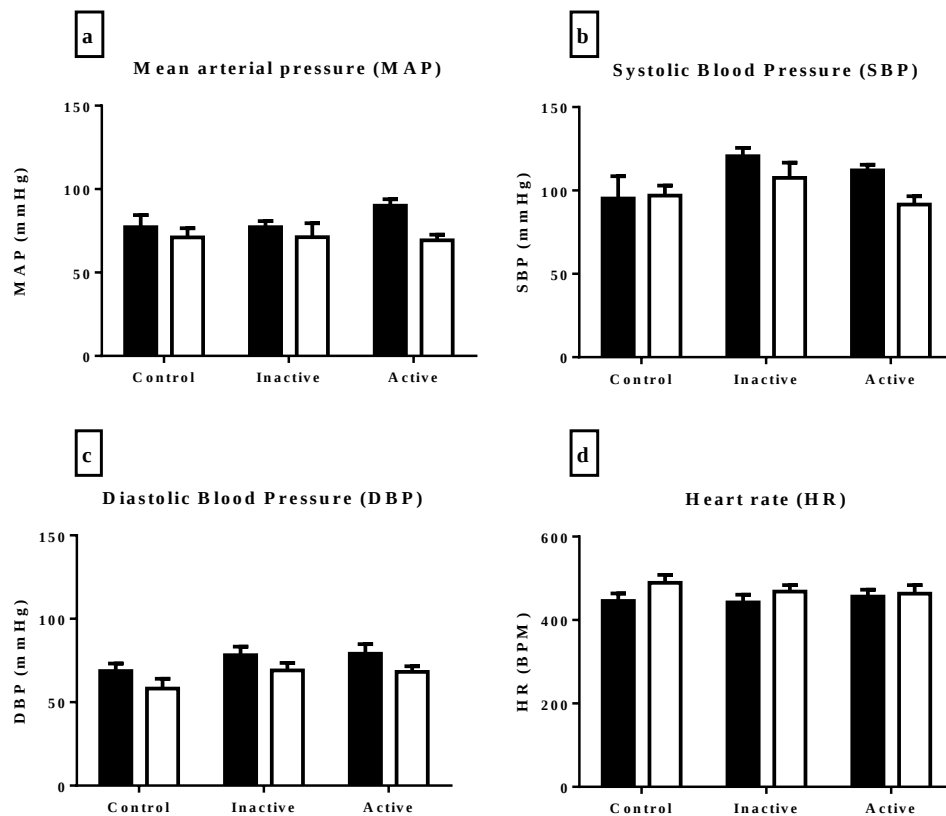


Figure 3. Cardiac parameters (A, mean arterial pressure – PAM, B, systolic blood pressure – SBP, C, diastolic blood pressure – DBP and D, heart rate - HR) of offspring of rats, at 30 days old. The groups were constituted by NP (n=8), LP (n=8), NP-inactive (n=8), NP-active (n=8), LP-inactive (n=8) and LP-active (n=8). Values are presented as the mean $\pm$ S.E.M. Was used the unpaired Student's test and for intragroup analysis used one-way ANOVA.

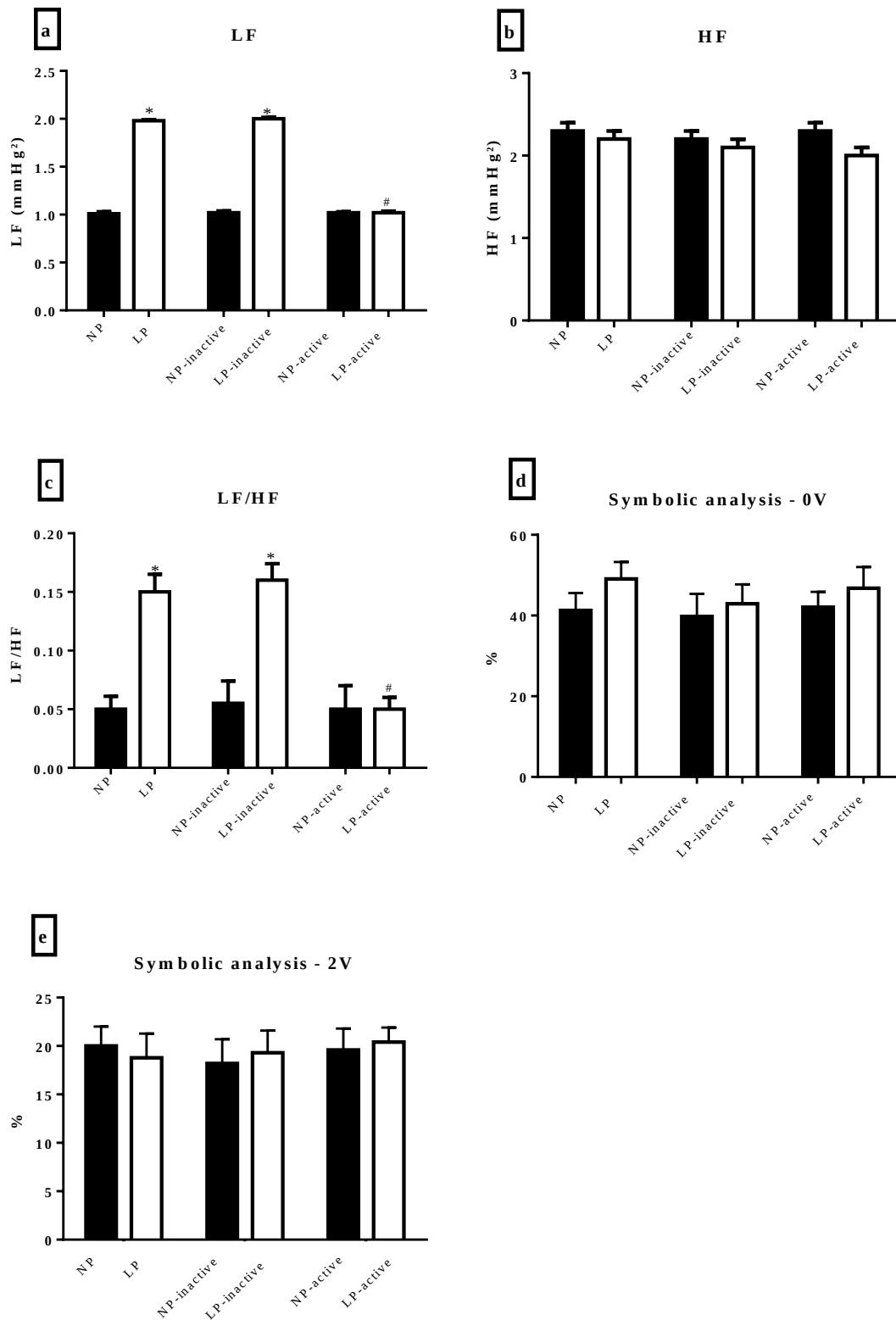


Figure 4. Cardiovascular variability of the systolic pressure (PS). The low-frequency bands – LF (A), high-frequency bands – HF (B), ratio LF/HF (C), nonlinear heart rate variability of the 0V sequences (D) and nonlinear heart rate variability of the 2V sequences (E) of offspring of rats, at 30 days old, from mothers submitted to a

normoprotein diet (NP, 17% protein, n=8) or low-proten diet (LP, 8% protein, n=8) during pregnancy and lactation. And from mothers that performed voluntary physical activity (NP-inativo, n=8, NP-active, n=8, LP-inativo, n=8 and LP-active, n=8). Values are presented as the mean $\pm$ S.E.M, $p < 0.05$. * Mean values were significantly different (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test). # Mean values were significantly different after intragroup analysis (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test).

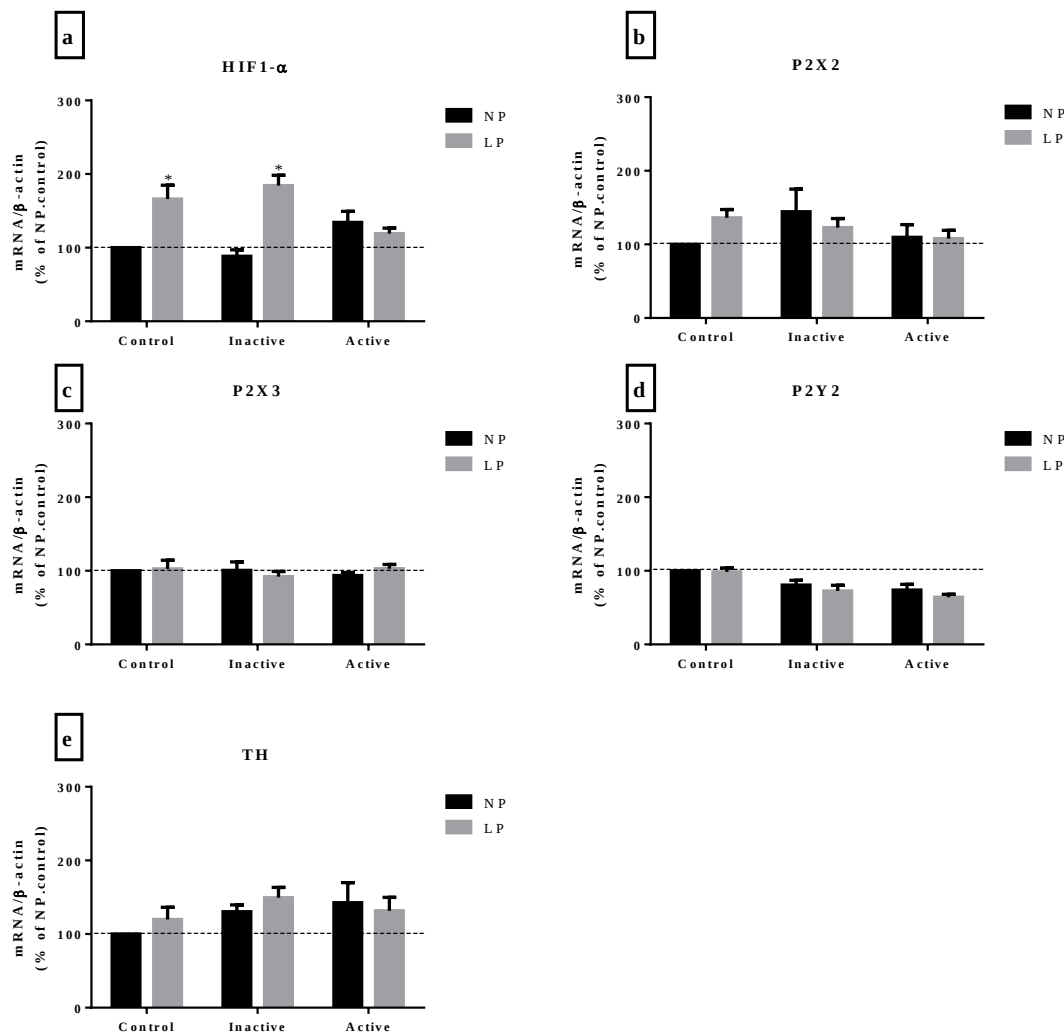


Figure 5. Expression of HIF-1 α (A), P2X2 (B), P2X3 (C), P2Y2 (D) and TH (E) in CB of offspring of rats, at 30 days old, from mothers submitted to a normoprotein diet (NP, 17% protein, n=5) or low-protein diet (LP, 8% protein, n=5) during pregnancy and lactation. And from mothers that performed voluntary physical activity (NP-inactive, n=5, NP-active, n=5, LP-inactive, n=5 and LP-active, n=5). Values are presented as the mean $\pm$ S.E.M, $p < 0.05$. * Mean values were significantly different after intragroup analysis (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test).

Tables

Table 1. Composition of the diets.

Ingredients	AIN-93M* g/100g	AIN-93G* g/100g	
		NP	LP
Corn Starch (87% carbohydrates), g	46.47	39.74	50.34
Casein, g	14.10	20.00	9.41
Dextrinized starch (92% tetrasaccharides), g	15.50	13.20	13.20
Sucrose, g	10.00	10.00	10.00
Soya oil, g	4.00	7.00	7.00
Cellulose, g	5.00	5.00	5.00
Mineral mixture (AIN-93-MX), g	3.50	3.50	-
Mineral mixture (AIN-93-GX), g	-	-	3.50
Vitamin mix (AIN-93-VX)*, g	1.00	1.00	1.00
L-Methionine, g	0.18	0.30	0.30
Choline bitartrate (41,1% choline), g	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone (TBHQ), g	0.008	0.014	0.014
Macronutrients			
Total energy	3.44	3.56	3.56
Proteins	14%	18%	8%
Lipids	11%	18%	18%
Carbohydrates	75%	64%	74%

*(REEVES, NIELSEN et al., 1993)

Table 2. Experimental groups classified according to daily physical activity (distance traveled, estimated calorie burned and time) in the running wheel.

Experimental groups	n	Distance traveled (km/day)	Estimated calorie burned (km/s/day)	Time (min/day)
Control	10	0	0	0
Inactive	10	≤ 1	≤ 10.0	≤ 20.0
Active	10	$> 1.0 \leq 5.00$	$> 10.0 \leq 40.0$	$> 20.0 \leq 120.0$

Adapted Santana Muniz et al. 2014

Table 3. Serum biochemical parameters (total protein, albumin, trygliceride, total cholesterol and glucose) of offspring of rats at 22 days old, from control, inactive and active dams subjected to a normo-protein diet (NP, 17% protein, n=8) or low-proten diet (LP, 8% protein, n=8) during pregnancy and lactation.

22 days old						
	NP	LP	NP- inactive	NP- active	LP- inactive	LP-active
Total ptn	6.1±0.1	5.3±0.1*	6.1±0.1	5.2±0.7	4.88±0.01*	5.4±0.1 [#]
Albumin	2.6±0.1	2.1±0.1*	3.1±0.1	3.2±0.2	2.1±0.1*	2.6±0.3 [#]
Triglyc	130±8	77±6*	132±7	131±4	85±5*	131±4 [#]
Total chol	122±11	89±6*	102±4	110±3	54±4*	117±12 [#]
Glucose	107.9±3.7	134.1±5.3*	123.6±7.1	120±10.1	187.2±5.1*	110.1±5.2 [#]

* differences between LP and LP-inactive vs. NP and NP-inactive respectively

(p<0.05; two-way ANOVA). [#] differences between LP and LP-inactive vs. LP-active

(p<0.05; two-way ANOVA). Groups: NP-inactive (offspring of dams who received

NP diet and who presented an inactive phenotype), NP-active (offspring of dams

who received NP diet and who presented an active phenotype), LP-inactive

(offspring of dams who received LP diet and who presented an inactive

phenotype) and LP-active (offspring of dasms who received LP diet and who

presented an active phenotype). Values are presented as mean ± S.E.M.

Table 4. Sequences of primers used for the real-time RT-PCR analysis

Gene	F/R	Sequencia 5'-3'	Tm (°C)
β-actin	F	CCTGACCCTGAAGTACCCCATTG	60
	R	CATGGCTGGGGTGTGGAAGGTC	
HIF-1α	F	GCGAGAACGAGAAGAAAAATAGG	60
	R	GCACCTAGAAGTTTCCTCACACG	
P2X2	F	TGGGACTACGAGACGCCTAA	60
	R	CAGGATGAGAAGCTGCACCA	
P2X3	F	TAAAGGGACAGGCTCCCAT	60
	R	CCTACAGGACAGGGAGACGA	
P2Y2	F	AAAGAGGAACGAACACCGGG	60
	R	GTCACGTAATGGGCTCTCCC	
TH	F	AAAGAGGAACGAACACCGGG	60
	R	GTCACGTAATGGGCTCTCCC	

F: forward sequence; R: reverse sequence.

Sequences of Inducible Hypoxia Factor 1α (HIF-1α), Purinergic Receptor P2X 2 (P2X2), Purinergic Receptor P2X 3 (P2X3), Purinergic Receptor P2Y2 (P2Y2), Tyrosine Hydroxylase (TH).

APÊNDICE B - ARTIGO 2 - Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers

Artigo publicado na **Hypertension Research** Fator de Impacto: **3.43**



Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of protein-restricted mothers

Viviane Nogueira¹ · Jose Brito-Alves¹ · Danilo Fontes¹ · Larissa Oliveira² · Waldecy Lucca² · Yves Toumeur^{1,3} · Almir Wanderley⁴ · Glauber S. F. da Silva⁵ · Carol Leandro¹ · João Henrique Costa-Silva¹

Received: 13 March 2017 / Revised: 12 March 2018 / Accepted: 26 March 2018
 © The Japanese Society of Hypertension 2018

Abstract

The aim of this study is to evaluate the short-term and long-term effects elicited by carotid body removal (CBR) on ventilatory function and the development of hypertension in the offspring of malnourished rats. Wistar rats were fed a normo-protein (NP, 17% casein) or low-protein (LP, 8% casein) diet during pregnancy and lactation. At 29 days of age, the animals were submitted to CBR or a sham surgery, according to the following groups: NP-cbr, LP-cbr, NP-sham, or LP-sham. In the short-term, at 30 days of age, the respiratory frequency (RF) and immunoreactivity for Fos on the retrotrapezoid nucleus (RTN; brainstem site containing CO₂ sensitive neurons) after exposure to CO₂ were evaluated. In the long term, at 90 days of age, arterial pressure (AP), heart rate (HR), and cardiovascular variability were evaluated. In the short term, an increase in the baseline RF (~6%), response to CO₂ (~8%), and Fos in the RTN (~27%) occurred in the LP-sham group compared with the NP-sham group. Interestingly, the CBR in the LP group normalized the RF in response to CO₂ as well as RTN cell activation. In the long term, CBR reduced the mean AP by ~20 mmHg in malnourished rats. The normalization of the arterial pressure was associated with a decrease in the low-frequency (LF) oscillatory component of AP (~58%) and in the sympathetic tonus to the cardiovascular system (~29%). In conclusion, carotid body inputs in malnourished offspring may be responsible for the following: (i) enhanced respiratory frequency and CO₂ chemosensitivity in early life and (ii) the production of autonomic imbalance and the development of hypertension.

Keywords Arterial pressure · Chemosensitivity · Malnutrition · Protein restriction · Ventilation

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41440-018-0104-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ João Henrique Costa-Silva
joao.hcsilva@ufpe.br

¹ Department of Physical Education and Sports Sciences, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

² Department of Morphology, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

³ Centre National de la Recherche Scientifique, Université Claude Bernard, Lyon 1, Lyon, France

⁴ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁵ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Introduction

Protein restriction experienced in utero or during perinatal life (pregnancy, lactation, and first infancy) has been proposed as a predisposing factor to the development of arterial hypertension and metabolic diseases in later life [1–6]. Although the relationship between a maternal low-protein diet during pregnancy and lactation and the development of arterial hypertension in offspring in adult life has been previously described, the underlying mechanisms are poorly understood.

Recent work has found that rats subjected to a maternal low-protein diet during pregnancy and lactation exhibited enhanced respiratory and sympatho-excitatory responses to peripheral chemoreflex activation at an early age [2, 7] and autonomic dysfunction and hypertension during adulthood [1, 2]. These respiratory changes appear to be linked to alterations in both peripheral and central chemoreceptor functions, but without an influence on baroreflex control [8, 9]. In a previous study, Elton et al. [10] related that an

imbalance in acid–base control in the blood can cause changes in chemosensitivity. They suggested that a modification in the respiratory chemoreflex can be elicited by acute or chronic deviations in O_2/CO_2 partial pressure (PO_2/PCO_2) in the arterial blood or brain, mainly through the detection of changes in pH [10]. However, this hypothesis for the respiratory changes observed in maternal protein restriction-induced hypertension has not yet been tested.

Higher CO_2 levels in the body can be elicited by apnea or pathologic conditions. Normally, these high levels are detected by sensor neurons located within the brainstem. These neurons are mainly located in the medulla and include the neurons in the retrotrapezoid nucleus (RTN), which are activated to restore normal blood gas levels [11, 12]. A recent study demonstrated that low-protein rats exhibited higher respiratory responses when exposed to high CO_2 levels (7% CO_2), suggesting that the neuronal network of the CO_2 chemoreception may be enhanced in low-protein rats [2].

The RTN is an important region of the brainstem involved in the integration of central and peripheral chemosensory information [11, 13, 14]. The RTN comprises a heterogeneous group of neurons that contributes to the control of CO_2/H^+ levels in the body and central chemoreception [11, 15]. This control is strongly modulated by peripheral inputs from the carotid bodies (CBs) located at the bifurcation of the common carotid artery on both sides of the neck, and the CBs are considered the main peripheral chemoreceptor site [16, 17]. These CB chemoreceptors play an important function in respiratory and cardiovascular homeostatic control. Their activation by hypoxia or hypercapnia/acidosis induces sympathetic-respiratory overactivity and enhancement of blood pressure [10].

Recently, it has been shown that CB dysfunction could be associated with hypertensive pathological conditions [18–21]. One hypothesis suggested that CB dysfunction may lead to changes in breathing control, O_2 and CO_2 chemosensitivity [22] and the development of sympathetic overactivity and arterial hypertension [18–21]. Interestingly, recent reports have shown that the removal of the CBs can be used as a therapeutic tool to reduce arterial blood pressure in hypertensive clinical-experimental situations [23–25]. These recent findings suggest that CB removal (CBR) could provide an effective antihypertensive treatment. However, the role of the CBs on the onset of the ventilatory and autonomic dysfunctions induced by maternal protein restriction, as well as their central implications in the neuronal network in the RTN and on the development of arterial hypertension in this condition, have not yet been tested.

In the present work, we tested the hypothesis that CBs play a key role early in life, inducing the genesis of ventilatory and autonomic dysfunctions, which lead to the

establishment of sympathetic overactivity and hypertension in the low-protein rats during adulthood. These autonomic and respiratory effects are elicited by changes in the blood levels of PaO_2 , $PaCO_2$, and pH, which increase the activation of both CBs and RTN cells, leading to increased activity of the sympathetic nervous system and the development of hypertension during adulthood.

Materials and methods

Animals and experimental groups

Twenty female Wistar rats were used. The experimental protocols were approved by the Ethical Committee of the UFPE, Brazil (23076.0110022013-79). Two groups were formed based on dietary manipulations: mothers fed a diet with 17% protein (normal protein—NP, $n=10$) and mothers fed a diet with 8% protein (low protein—LP, $n=10$) ad libitum. Both diets were isoelectric (Table 1) and prepared according to the American Institute of Nutrition [26]. The diets were offered during pregnancy and lactation. After birth (24 h), the offspring were grouped into litters with eight pups. At weaning (postnatal day 22), in order to avoid the influence of the estrous cycle of the females, only males were used. Two or three male offspring from each litter were randomly collected and housed together in cages. These received a standard diet (52% carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids, Purina Agriband, São Paulo, Brazil) and water ad libitum. The NP and LP experimental groups were formed with two or three rats from each litter. To evaluate the weight gain of the offspring, they were weighed at 1, 7, 14, 21, 30, and 90 days of

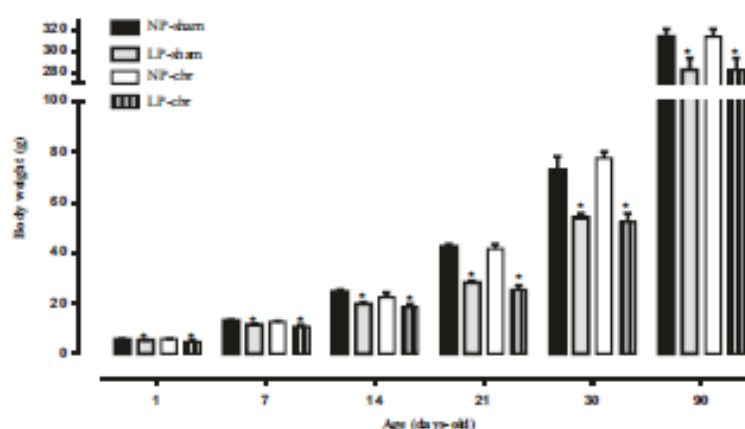
Table 1 Nutritional composition of the experimental diets (g/100 g diet)

Nutrient	Normal protein (17% protein) ^a	Low protein (8% protein)
Casein (85%) ^b	20	9.41
Dextrin cornstarch	13.2	13.2
Cellulose	5	5
Sucrose	10	10
Cornstarch	39.74	50.34
Soybean oil	7	7
Choline	0.25	0.25
Methionine	0.3	0.3
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	3.5	3.5
Energy density (kJ g ⁻¹)	16.26	16.26

^aBased on AIN-93 standard diet

^bThe casein used in preparation of diet was 85% pure

Fig. 1 Maternal protein malnutrition promotes reduction of body mass. Evaluation of body mass (g) of 1-, 7-, 14-, 21-, 30-, and 90-day-old rats of mothers fed NP or LP diet during pregnancy and lactation. Data are shown in means $\pm$ SEM ($n = 14$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or carotid body removal—Cbr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ NP vs. LP



life (Fig. 1). Experiments were performed in 30-day-old or 90-day-old rats for ventilatory and cardiovascular studies, respectively.

Cardiovascular recordings

One day before the experiments, the offspring were anesthetized with ketamine (80 mg kg^{-1} , i.p.—CEVA, Paulínia/SP, Brazil) and xylazine (10 mg kg^{-1} , i.p.—CEVA, Paulínia/SP, Brazil). Supplemental doses of anesthetic were given as required to maintain the rats at a depth of anesthesia at which a hind paw pinch evoked no motor reflex. After confirmation of anesthesia, the femoral artery and vein were cannulated (PE-50 connected to PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). The catheters were filled with heparinized saline ($\text{NaCl } 0.9\% + \text{heparin } 0.05\%$), tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. After surgery, the animals received an anti-inflammatory drug (ketoprofen 5 mg kg^{-1} , s.c.—Medley, Brasília/DF, Brazil).

After a period of 18–24 h, animals were healthy with standard values of blood pressure and heart rate, without showing clinical signs of pain or suffering. Moreover, no weight loss was observed. Although long-lasting recordings of HR and MAP were not performed, the rats showed signs of anesthesia recovery. The MAP and HR (obtained through pulsatile arterial pressure) were recorded in unanesthetized and freely moving animals, in the light phase, by connecting the arterial catheter to a pressure transducer. The signals were amplified (ML866/P, ADInstruments, PowerLab, Bella Vista, NSW, Australia), sampled at 2 kHz, digitalized (PowerLab, model 4/30, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) and recorded using appropriate software (LabChart7 Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Recordings of baseline pulsatile arterial pressure (PAP), MAP, and HR were performed for 60 min.

Ventilatory recordings

Respiratory frequency (RF), tidal volume (VT), and ventilation (VE) were performed simultaneously with the cardiovascular recording in unanesthetized conditions and in freely moving animals using the whole-body plethysmography method [27]. Before recording the baseline data, the rats were placed into a Plexiglas chamber (5 L) for a period of acclimatization (~ 60 min). The chamber was flushed with humidified air and maintained at 25°C . After the rats had been acclimatized, their ventilatory parameters were recorded as the airflow to the chamber was suspended for short periods (~ 3 min), and the pressure oscillations caused by breathing were captured by a pressure differential transducer connected to a signal amplifier (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The signals were then captured by an acquisition system and data analysis was performed (PowerLab; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). All data were analyzed off-line with the use of appropriate software (LabChart 7 Pro; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia).

Respiratory chemoreceptor activation

To provide activation of respiratory chemoreceptors, the plethysmographic chamber was flushed with a humidified gas mixture containing 7% CO_2 , 21% O_2 , and 72% N_2 (Linde*, Jundiaí-SP, Brazil) for 60 min, and respiratory responses were continuously recorded.

Measurements of the blood gas levels

To assess the acid–base status (at 29 days old) a blood gas analysis was performed. Blood samples ($200 \mu\text{L}$) were quickly collected (less than 1 min for each collection) through the arterial catheter. The pH, PaCO_2 , PaO_2 , and

HCO_3^- levels were determined by a multifunctional gas analyzer (Gem® Premier 3000, Germany). The arterial blood gases were assessed in the unanesthetized offspring during the resting period (normoxia) and after 5, 30, and 60 min of exposure to hypercapnia (7% CO_2).

Carotid body removal

To evaluate the role played by CB (peripheral chemoreceptors) on the ventilatory (short-term effects) and cardiovascular changes (long-term effects), a carotid body removal (CBR) was performed on 29-day-old rat offspring from mothers subjected to perinatal NP or LP diet. CBR and sham surgery were performed under aseptic conditions with the body temperature maintained close to 37 °C. Anesthesia was induced by ketamine (80 mg kg⁻¹, i.p.—CEVA, Paulínia/SP, Brazil) and xylazine (10 mg kg⁻¹, i.p.—CEVA, Paulínia/SP, Brazil). The CBs were isolated following a mid-line incision in the ventral surface of the neck and physically removed with forceps. In addition, the carotid sinus nerves were not removed, and this surgical procedure did not damage the carotid arteries. The incisions were then closed in two layers (muscle and skin) with absorbable sutures and vet bond adhesive. After surgery, rats were monitored and received an anti-inflammatory drug (ketoprofen 5 mg kg⁻¹, s.c.—Medley, Brasília/DF, Brazil). Sham surgery consisted of exposing the carotid bifurcation bilaterally without damaging the carotid bodies or the surrounding nerves. Four experimental groups were designed according to the diet manipulation and CBR: NP-sham ($n = 14$), LP-sham ($n = 14$), NP-cbr ($n = 14$), and LP-cbr ($n = 14$).

After 24 h of the surgical procedure and before cardiovascular and respiratory protocols, the efficacy of the CB removal was tested in unanesthetized freely moving rats by injection of potassium cyanide (KCN 0.04%, 100 µL per rat, i.v. Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil). KCN injection activates the carotid body, resulting in bradycardia and increased pressure [28]. The absence of typical cardiovascular responses (bradycardia and pressor response) to KCN injection was used as functional evidence of the CB removal in our animals, as shown in the supplementary figure 1. Thus, the CBR groups only contained animals that did not respond to KCN.

Experimental protocols

Evaluation of the short-term effects elicited by CBR on the ventilation, respiratory responses to CO_2 and RTN cell activation (fos)

Some rat offspring were subjected to CBR or Sham at 29 days of age, and at 30 days of age, they were evaluated

for ventilation, respiratory responses to chemoreceptor activation and blood gas levels following 60 min of exposure to CO_2 , as described in the Ventilatory recordings, Respiratory chemoreceptor activation, and Measurements of the blood gas levels sections, respectively. To evaluate RTN cell activation, after hypercapnia exposure for 60 min, the animals were perfused and the brains were collected and cryoprotected for immunofluorescence processing for Fos protein. Frozen serial transverse sections (20 µm) of the brains were collected on gelatinized glass slides. All sections were processed at room temperature (22 °C) and washed with a phosphate buffer (0.01 M) and a saline isotonic (PBS, pH 7.4) five times for 5 min and then incubated with 0.1 mM glycine in PBS for 10 min. Non-specific protein binding was blocked by incubation of the sections for 30 min in a solution containing 2% bovine serum albumin (BSA). After that, the sections were incubated overnight with rabbit anti-Fos as primary antibodies (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, USA). Afterwards, the sections were incubated for two hours with donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 secondary antibodies (1:2000, Life Technologies, USA). After each stage, the slices were washed with PBS five times for 5 min [29].

Fos-positive images of brain areas were acquired for each animal with an AxioVision (Carl Zeiss® S.A.S., France). The brain sections with clear marking of the RTN were acquired and classified into regions according to the Paxinos and Watson atlas [30]. The images were collected on a $\times 10$ objective, and counting was performed in series of three (count one slice and dismissed three) [11, 31]. Neurons were counted using the free software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) with a custom-built plug-in (written by the authors) that uses fluorescence intensity to select and count the Fos-positive cells.

Evaluation of the long-term effects elicited by CBR on the autonomic dysfunction and hypertension induced by the maternal low-protein

Some rat offspring who were subjected to CBR or Sham at 29 days of age, were evaluated for arterial pressure, heart rate and cardiovascular variability at 90 days of age. At 89 days of age, the groups were subjected to the surgical procedure and cardiovascular recordings (as described in the Cardiovascular recordings section). To evaluate the contribution of the sympathetic vascular tone to the cardiovascular system, an intravenous injection of the ganglionic blocker (hexamethonium; 25 mg kg⁻¹, Sigma-Aldrich®, USA) was given [32]. The sympathetic tonus was calculated by the difference between the MAP after the blocker and the resting MAP [1].

Cardiovascular variability and autonomic modulation of the vascular resistance and cardiac function measurements

Carotid body removal normalizes arterial blood pressure and respiratory frequency in offspring of...

Table 2 Values of arterial pH (pHa), arterial carbon dioxide partial pressure (PaCO₂), arterial oxygen partial pressure (PaO₂), and plasma bicarbonate (HCO₃⁻) of Wistar rats normo-protein (NP) or low-protein (LP) subjected to hypercapnia (7% CO₂)

	NP (17%, n = 7)								LP (8%, n = 11)							
					7% CO ₂								7% CO ₂			
	Room air		5 min		30 min		60 min		Room air		5 min		30 min		60 min	
	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM	Mean	EPM
pHa	7.42	0.02	7.27	0.03	7.23	0.03	7.24	0.05	7.44	0.01	7.32	0.01	7.27	0.02	7.24	0.02
PaCO ₂ (mmHg)	29.00	1.23	39.28	1.71	49.71	1.55	48.66	2.77	28.45	1.49	42.09	2.81	47.45	3.04	47.90	1.73
PaO ₂ (mmHg)	111.28	5.81	143.86	4.73	149.71	7.19	151.16	8.70	105.09	7.82	139.36	7.62	148.72	6.91	149.54	7.59
HCO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	18.87	1.00	18.35	1.20	21.40	1.69	21.36	2.29	19.42	0.97	21.67	1.42	22.08	1.57	21.25	1.68

Values are expressed as mean and SEM. Student's *t*-test unpaired ($p < 0.05$) for comparison between the NP and LP groups. All parameters were evaluated using *t*-test

were performed through the analysis of variability of systolic arterial pressure (SAP) [1]. The power of the oscillatory components obtained from rats of the NP and LP groups was quantified into two frequency bands: low frequency (LF: 0.20–0.75 Hz), representative of the modulatory effects of sympathetic activity controlling vascular tone and heart activity, and high frequency (HF: 0.75–3.0 Hz), associated with a respiratory or parasympathetic modulation of the heart [33–35]. The cardiac component of the spontaneous baroreflex sensitivity was also calculated through a sequence method using the computer software CardioSeries (version 2.4, available at <https://www.sites.google.com/site/cardiocseries/home>) [1, 36].

Statistical analysis

Values are presented as the mean and standard error of the mean (S.E.M.). Data were compared using Student's unpaired *t*-test (measurements of the blood gases), or one-way (measurements of RTN cell activation by Fos immunoreactivity) or two-way (ventilation and cardiovascular parameters) ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. These tests were performed after analysis of data distribution (Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests). Differences between groups with $p < 0.05$ were considered significant. GraphPad Prism 5.0* software was used to perform the analysis.

Results

Effects of malnutrition on weight

As an indication of weight gain, it was observed that offspring from mothers subjected to protein malnutrition during pregnancy and lactation (LP-sham and LP-cbr)

presented lower weight from 1 day of age up to 90 days of age compared to the control group (NP) (Fig. 1).

Measurements of the blood gases

In Table 2, blood variables measured under room air and hypercapnia in the NP and LP groups of rat offspring are summarized. At 30 days of age, the offspring from mothers undergoing perinatal low-protein diets had similar pH, PaCO₂, PaO₂, and HCO₃⁻ values in both room air and during hypercapnia (7% CO₂). As expected, PaO₂ and PaCO₂ increased and arterial pH decreased during hypercapnia in all animal groups, but no differences were found between the NP and LP groups.

Short-term effects of CBR on the respiratory parameters

At 30 days of age, the rat offspring classified in the LP-sham group exhibited an increase in RF (Fig. 2a) during room air and hypercapnic conditions compared to NP-sham. Interestingly, the RF of LP-cbr was similar to that of NP-sham. However, VT (Fig. 2b) and VE (Fig. 2c) were similar for all groups under room air and hypercapnia conditions, and CBR did not modify these parameters.

Fos immunoreactivity revealed the level of cell activity in the RTN following CO₂ exposure. Figure 3 (panel A) depicts a drawing of one coronal brainstem section (coordinates: interaural: -1.52 mm and Bregma: -10.52 mm) highlighting the RTN area considered in the quantifications, as well as representative photomicrographs of each experimental group. Although RTN neurons were not stained with a specific marker for CO₂-sensitive neurons, our results shown in Fig. 3b reveal that rat offspring classified in the LP-sham group had increased cell activity in the RTN when compared with the control group (NP-sham). However, this difference was abolished after CBR (LP-cbr group), and the

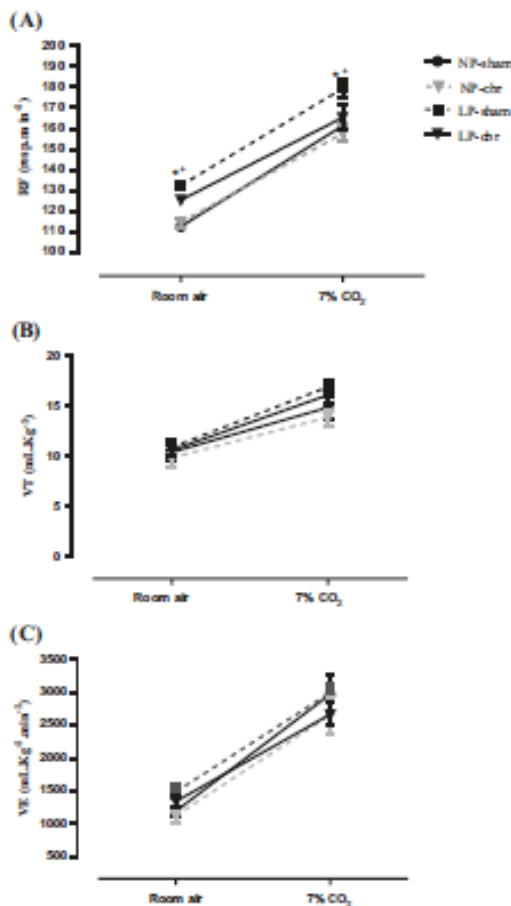


Fig. 2 Bilateral carotid body removal (Chr) improves respiratory frequency in protein-restricted rats. Evaluation of respiratory frequency (RF) (a), tidal volume (VT) (b) and ventilation (VE) (c) at room air (0) and after exposure to hypercapnia (7% CO₂) of 30-day-old rats of mothers fed NP or LP diet during pregnancy and lactation. Data are shown as the mean $\pm$ SEM ($n = 14$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or Chr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ NP vs. LP-sham; +Chr vs. Sham

cell activity in the RTN was similar to those of the control groups (NP-sham and NP-chr). On the other hand, CBR was not able to modify the Fos immunoreactivity in the RTN within NP groups (NP-sham vs. NP-chr), although there was a tendency to increase this activity.

Long-term effect of CBR on the cardiovascular parameters

Representative baseline recordings of PAP, MAP, and HR at 90 days of age in NP-sham, NP-chr, LP-sham, and

LP-chr rats are shown in Fig. 4a. LP-sham rats exhibited increases in arterial blood pressure compared to the NP-sham group ($p < 0.05$; Fig. 4b). CBR was able to prevent the development of hypertension in LP rats ($p < 0.05$; Fig. 4b) but did not induce any change in the arterial blood pressure of NP group. No differences among groups were noted in the HR ($p > 0.05$; Fig. 4c).

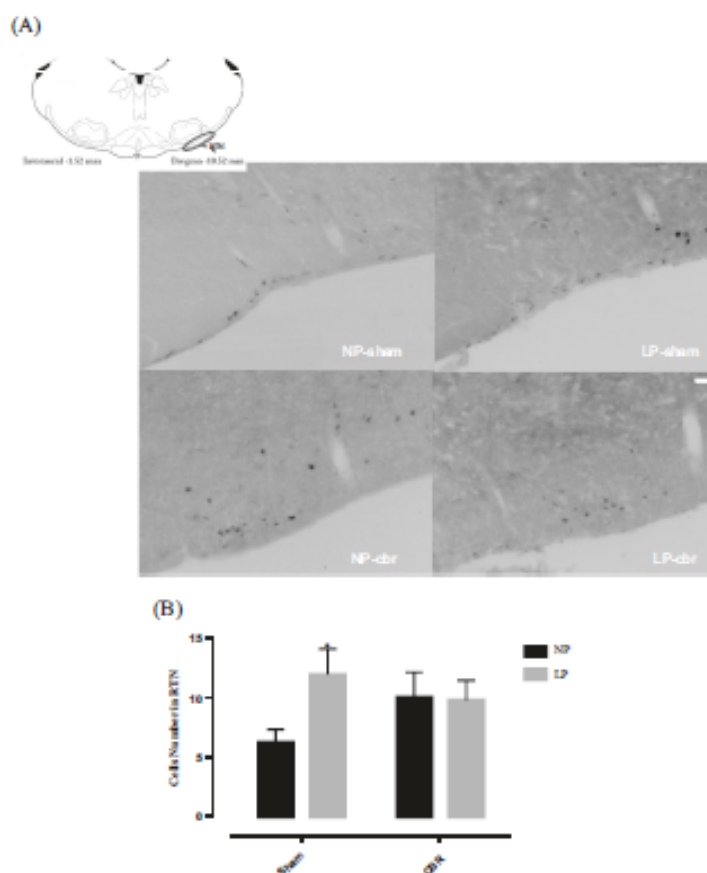
Regarding cardiovascular variability in the frequency domain and autonomic modulation on the vascular resistance and cardiac function, Fig. 5 shows the power of the oscillatory components obtained from rats of the NP and LP groups. LP-sham exhibited an increase in the oscillatory components in the LF range of systolic arterial pressure (SAP) when compared to the NP-sham (Fig. 5a). After CBR, LP-chr rats exhibited attenuation in magnitude of oscillatory components at LF when compared to the LP-sham rats, showing values similar to control animals (NP-sham and NP-chr). HF components of the SAP ($p > 0.05$; Fig. 5b) and LF/HF ratio were similar between groups ($p > 0.05$; Fig. 5c). In relation of the cardiac component to spontaneous baroreflex sensitivity, LP-sham and NP-sham rats exhibited similar spontaneous cardiac baroreceptor reflex gain, but the LP-chr rats exhibited a tendency to increase in this parameter ($p = 0.08$; Fig. 5d) when compared with NP-chr rats. However, no significant difference was noted, and specific studies should be provided to determine the role of the CBR on the baroreflex control in this experimental model.

Representative PAP and MAP recordings before and following ganglionic blocker with hexamethonium are shown in Fig. 6a. After administration of a ganglionic blocker, the delta MAP was greater in the LP group when compared to the NP group ($p < 0.05$; Fig. 6b). Interestingly, LP-CBR rats showed delta MAP similar to NP rats ($p < 0.05$; Fig. 6b).

Discussion

In the present study, offspring rats subjected to a low-protein diet during pregnancy and lactation exhibited increased respiratory frequency, higher activation in RTN cells and response to CO₂ at 30 days of age. Moreover, they showed higher levels of sympathetic tonus in the cardiovascular system, which contributed to the development of hypertension at 90 days of age. Furthermore, our findings denote a pivotal role of the CBs in both the ventilatory and cardiovascular changes observed in protein-restricted rats, as well as on the development of arterial hypertension in these animals. We demonstrated that offspring rats subjected to a low-protein diet showed an increased Fos immunoreactivity in the RTN cells, which suggests increased RTN neuronal activity in the juvenile male

Fig. 3 Protein-restricted rats have increased neuronal activity levels in the RTN during hypercapnia. **a** One schematic coronal section of the brainstem showing the RTN area considered for analyses (red circle) and four representative photomicrographs of the coronal section of RTN showing the c-Fos immunoreactivity (black points) in the different groups (NP-sham, LP-sham, NP-cbr, and LP-cbr). White scale bar: 500 μ m. **b** Evaluation of neuronal activity in RTN of 30-day-old rats of mothers fed NP or LP diet during pregnancy and lactation. Data are shown as the mean $\pm$ SEM ($n = 6$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or carotid body removal—Cbr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ NP vs. LP



offspring. In addition, CBR proved effective in the short term, with the normalization of RF at baseline and after CO_2 exposure, at least in part by reducing the activation of the RTN cells. In the long term, CBR prevented autonomic dysfunction and the development of hypertension in rats subjected to maternal low-protein diets. These results are the first to support the notion that CBs contribute to both the respiratory and cardiovascular changes elicited by a maternal low-protein diet.

The CBs are the main peripheral chemoreceptors that sense arterial PO_2 , PCO_2 , and pH. In response to hypoxemia, hypercapnia, and acidosis, carotid chemosensory discharge elicits reflex respiratory, autonomic, and cardiovascular adjustments [37, 38]. One of our working hypotheses was that the blood levels of PaO_2 , PaCO_2 , and pH would be altered in the maternal low-protein animal model. This change would lead to ventilatory and autonomic dysfunction observed in this experimental model. However, our data indicated that the enhanced RF observed

early in life in the low-protein animals did not appear to be associated with an imbalance in the blood acid-base control. One reason may be that during resting, normoxia was present, and after exposure to hypercapnia, the NP and LP animals showed similar gasometric values, suggesting that maternal protein malnutrition did not promote an acid-base imbalance. Thus, our initial hypothesis was not confirmed, but rather our data highlighted the possible role of the CBs and central neuronal network responsible for respiratory control in the observed cardio-respiratory disruption.

Recently, *in situ* studies observed that the offspring of rats from mothers submitted to protein malnutrition during pregnancy and lactation showed increases in both frequency and amplitude of phrenic nerve firing, which may increase the activity of the diaphragm (inspiratory muscle) and enhance RF in these animals early in life [39]. In the present study in freely moving animals, it was possible to reproduce this increase in RF. Similar to that observed in the *in situ* rat model [39], ventilatory changes were independent of PaO_2 ,

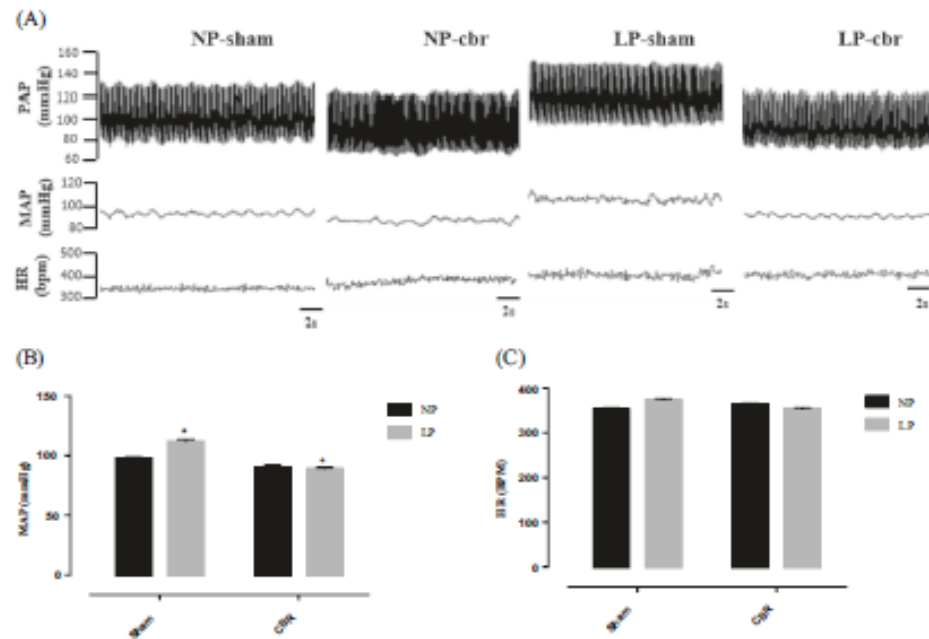


Fig. 4 Bilateral carotid body removal (Cbr) restores arterial blood pressure in protein-restricted rats. Representative tracing of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR) at rest (room air) (a). Mean values of the MAP (b) and HR (c) of 90-day-old rats of dams fed NP or LP diet during pregnancy and

lactation. Data are shown as means $\pm$ SEM ($n = 14$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or Cbr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ NP vs. LP; †Cbr vs. Sham

PaCO_2 , and pH levels of the blood, suggesting that increased RF may arise from changes in CB physiology and central respiratory rhythm modulation. Additional evidence concerning the role of the CBs was shown in the same study, where the authors found high levels of inducible hypoxia factor one alpha (HIF-1 α) in the CBs of protein-restricted rats at an early age. The increased expression of this transcription factor may be implicated in CB dysfunction in this experimental model of maternal protein undernutrition. In addition, the functional aspects of increased RF without VE changes need to be further explored.

Previous studies have demonstrated that CB dysfunction can lead to increased respiratory drive, autonomic dysfunction, and hypertension [40–44]. These studies described new evidence concerning the heightened CB activity as a major driver of sympathetic activation and hypertension in different models. The CB chemoreceptors appear to generate an aberrant excitatory tone that drives up the sympathetic activity and causes high blood pressure [43, 45, 46]. Indeed, when this carotid body tone is switched off, the arterial pressure and sympathetic activity are reduced in spontaneously hypertensive rats [47]. In humans with hypertension, carotid body resection can substantially reduce arterial pressure [25, 48]. The removal of the CB can

be used as a therapy to reduce MAP. This procedure is able to decrease sympathetic activity [23, 24] and improve survival in patients with systolic heart failure [49].

Thus, these animal and human data support the presence of aberrant carotid body discharge as a contributor to hypertension. One of our hypotheses was that the increased respiratory drive observed in malnourished animals was caused by increased CB chemoreflex activity. If this was true, CBR at an early age would be able to normalize respiratory frequency. Our experiments involving CBR introduced new information concerning the role of CB in the development of ventilatory dysfunctions observed in this experimental model. The integrity of the CBs appears to be critical for the ventilatory changes induced by maternal low protein. After CBR, both baseline respiratory frequency and CO_2 chemosensitivity returned to standard values. This suggests that something is occurring in the CBs and their neural network to provide the ventilatory dysfunction observed in this model. This likely includes increased tonic activity of the CBs, more discharges through the nerves and consequent stimulation of the neural network. Studies have revealed that this enhancement of CB tonic activity may be related to adenosine and ATP release by glomus cells in the CBs [16, 50–53].

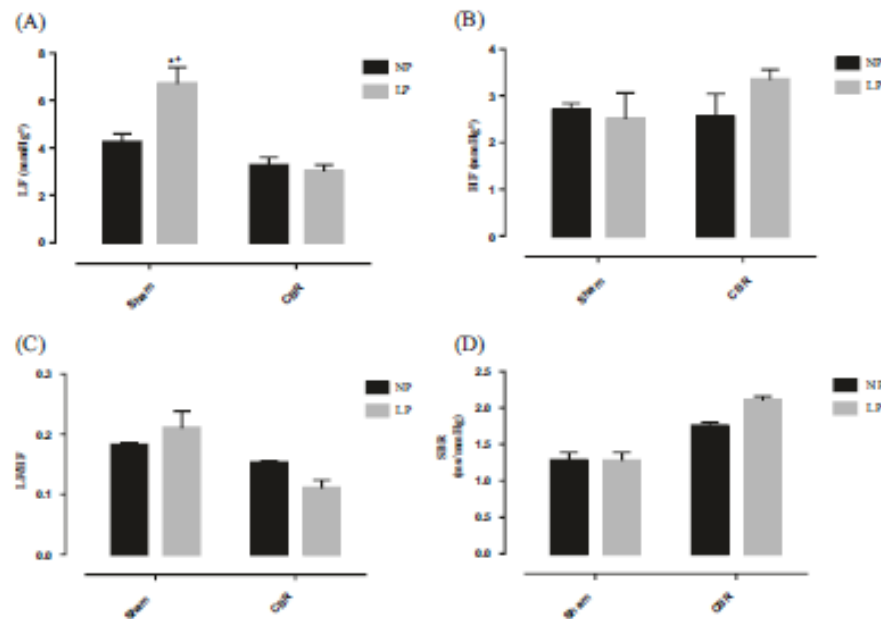


Fig. 5 Bilateral carotid body removal (Chr) restores the magnitude of the LF component in protein-restricted rats. Evaluation of average magnitudes of the low-frequency (LF) (a) and high-frequency (HF) (b) oscillatory components of systolic arterial pressure, LF/HF ratio (c) and spontaneous baroreflex (SBR) (d) of 90-day-old rats of

mothers fed NP or LP diet during pregnancy and lactation. Data are shown as the mean $\pm$ SEM ($n = 14$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or Chr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ NP vs. LP; **Chr vs. Sham

The CBs are linked to the brainstem via the carotid sinus nerve. The information arising from the CB by the afferent pathway is sent to the brainstem through the carotid sinus nerve afferent fibers to the nucleus of the solitary tract (NTS) [54–56]. The NTS receives information from the periphery of the body [38], processes the information and distributes it to various areas of the brainstem involved with autonomic and respiratory nerve output, among them the RTN [57]. The RTN comprises one of the main areas of chemoreceptor information integration with CO_2 sensitive neurons [13, 58]. Therefore, increased activity of the CBs leads to greater activation of the respiratory network, including the RTN neurons [57]. Thus, another hypothesis tested in the present study was that ventilatory changes observed in the juvenile offspring of mothers subjected to a low-protein diet would be linked to increased cellular activity of the RTN. To test this hypothesis, a protocol was performed for immunoreactivity of the FOS protein. At RTN regions of protein-restricted animals, an evident increase was observed in the cellular activity in relation to control. However, this difference in low-protein animals did not occur in animals that underwent the CBR procedure. These data strongly suggest that the greatest RTN activity exhibited by malnourished animals was linked to the

integrity of the CBs and seems to be important for the changes in CO_2 chemosensitivity and RF observed in this experimental model.

In the present study, the specific type and phenotype of the cells activated in the RTN was not able to be determined specifically. Therefore, studies need to be performed to assess neuronal populations and transmitter phenotypes. Furthermore, other experiments need to be conducted to assess whether a low-protein diet alters the structure of the carotid body, including the number and size of the glomus cells. In addition, genome-wide association studies (GWAS) represent advances in the understanding of the genetic basis of diseases, indicating the genes associated with an increase in type 2 diabetes, coronary artery disease, dyslipidemia, breast cancer, obesity, and respiratory changes such as asthma, chronic lung disease, and changes in respiratory patterns [59]. Some examples of these genes include the following: HHIP—hedgehog-interacting protein, which is significantly associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease, and HTR4-5-hydroxytryptamine receptor 4, which is a glycosylated transmembrane protein that functions in both the peripheral and central nervous systems to modulate the release of various neurotransmitters. These genes are often associated

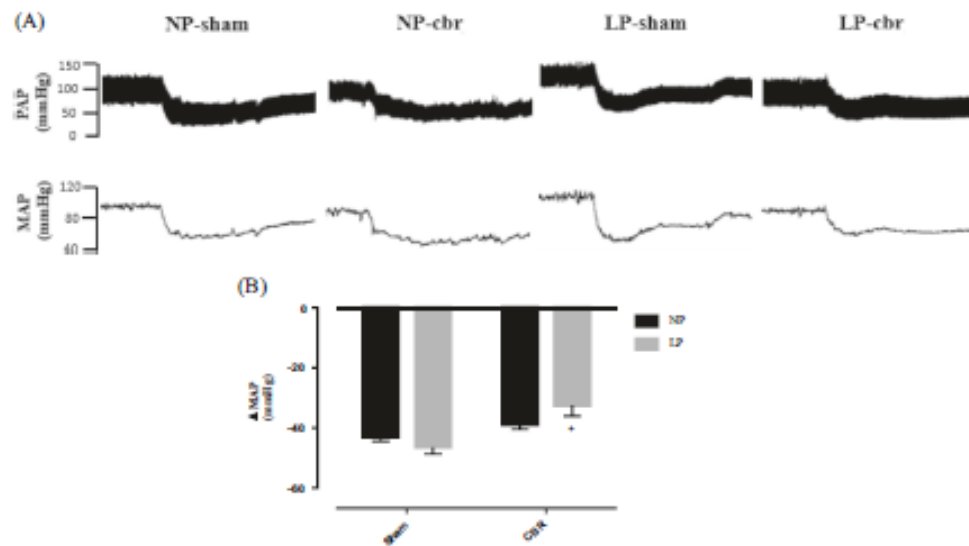


Fig. 6 Bilateral carotid body removal (Cbr) improves sympathetic tone in protein-restricted rats. Representative recordings of the pulse arterial pressure (PAP) and mean arterial pressure (MAP) after hexamethonium (25 mg kg^{-1}) (a). Evaluation of delta change of the MAP (b) of 90-day-old rats of mothers fed NP or LP diet during

pregnancy and lactation. Data are shown as the mean $\pm$ SEM ($n = 14$) and analyzed by two-way repeated measure ANOVA, with the mother's diet (NP, LP) and carotid body procedure (Sham or Cbr) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. * $p < 0.05$ Cbr vs. Sham

with a restriction in intrauterine growth [60, 61] and an increase in the susceptibility of developing diseases in adult life [62]. Regarding sustained arterial hypertension, two recent studies, linking increased blood pressure with GWAS, point to the genes serine/threonine kinase 39 (*stk39* kinase, which may serve as an intermediate in the response to cellular stress) and cadherin 13 (*CDH13*, which protects vascular endothelial cells from apoptosis due to oxidative stress and is associated with resistance to atherosclerosis) as two blood pressure regulating genes [63–65]. However, few variants were related to maternal protein malnutrition and their consequences on the respiratory chemoreflex and the development of hypertension.

Regarding the long-term effects elicited by maternal protein malnutrition on rat offspring, sympathetic overactivity, and arterial hypertension have been strongly reported in adulthood [1]. It is known that the etiology of arterial hypertension is multifactorial [8]. Among the main causes are changes in the renal system [66], such as alterations in the number and morphology of nephrons, alterations in the baroreflex control mechanism [67], increased production and reactive oxygen species in the brainstem [68], and hyperactivity of the sympathetic nervous system [1, 69]. However, in the present study, we showed that respiratory changes and changes in the carotid corpuscle contributed to the increase in blood pressure as

well as increased sympathetic nerve activity in animals from malnourished mothers.

Previous studies *in situ* have shown that the offspring of young (30-day-old) malnourished rats (7% protein during gestation and lactation) showed an increase in the phrenic nerve firing amplitude and an increase in the firing frequency and amplitude of the sympathetic thoracic nerves [39]. These results demonstrated that from early in life, malnourished animals present increased sympathetic nerve activity associated with increased respiratory frequency at baseline [2, 39]. It is suggested that these changes early in life contribute to the development of hypertension [39].

Herein, the hypothesis that the integrity of the CBs would be important for the development and establishment of these cardiovascular dysfunctions in adulthood was tested. We observed that the animals did not develop high blood pressure in adulthood (90 days of age) when subjected to CB removal early in life (30 days of age), suggesting that CBR was effective in the reduction of sympathetic tone and in the improvement of MAP in rats subjected to a maternal low-protein diet. Taken together, these results support the notion that CBs make an important contribution to the augmentation of the MAP in the maternal low-protein rat model. Furthermore, the present study found that the variability in the LF component of SAP, which exhibits a correlation with the sympathetic

drive to blood vessels, was lower in LP-cbr rats. Moreover, the sympathetic tone to the cardiovascular system, which was assessed pharmacologically, was normalized in LP rats subjected to CBR. Together, these data suggest that the integrity of the CBs is essential for developing cardiovascular dysfunctions in this experimental model. This suggests that sympathetic vascular activity in these animals was lower than LP without CBR, which may have contributed to a reduction in arterial pressure.

In addition, the animals presented similar levels when analyzed for the cardiac component of the spontaneous baroreflex sensitivity. Previous studies have shown that CBR provides an enhancement of baroreflex function [23, 47]. It is well established that the baroreflex is crucial in the short-term control of MAP, and a reduction in baroreflex sensitivity is associated with an increase in arterial pressure and the development of hypertension [70, 71]. However, a change in baroreflex function was not observed in the rats from mothers subjected to perinatal protein malnutrition [1, 9, 35]. Although these studies showed that hypertension in this experimental model was not related to dysfunctions in the baroreflex control mechanism [9], more studies will be necessary to investigate the baroreflex sensitivity after CBR.

Altogether, our data bring new insights into the etiological mechanisms underlying the development of arterial hypertension in rat offspring subjected to a maternal low-protein diet, suggesting a critical role for the carotid bodies (respiratory peripheral chemoreceptors). In conclusion, the carotid body inputs of malnourished offspring may be responsible for the following: (i) enhanced respiratory frequency and CO₂ chemosensitivity in early life and (ii) production of autonomic imbalance and development of hypertension. These findings are crucial in the understanding of why blood pressure increases in individuals submitted to low-protein intake during a critical period of life.

Acknowledgements

Funding We thank both Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco-PE-Brazil (grant no. APQ 1365-2.07/10; PRONEM 07974.05/14; APQ 1312-4.05/15) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brazil (grant no. 484452/2011-8; 478640/2013-7; 459341/2014-6) for financial support. JB-A is currently at the Department of Nutrition, Federal University of Paraíba, UFPB, Brazil.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. VN, and JB-A contributed to experiments with conscious rats. VON, JB-A, DP, LO, WL Jr, YT, GSPdS, AW, CL, and JHC-S contributed to the conception and experimental design, data analyses, and interpretation of the findings and the preparation of this manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25:123–30.
- de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr*. 2014;111:606–15.
- de Brito Alves JL, de Sousa VP, Cavalcanti Neto MP, Magnani M, Braga VA, da Costa-Silva JH, et al. New insights on the use of dietary polyphenols or probiotics for the management of arterial hypertension. *Front Physiol*. 2016;7:448.
- Barber DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341:938–41.
- Costa-Silva JH, Simoes-Alves AC, Fernandes MP. Developmental origins of cardiometabolic diseases: role of the maternal diet. *Front Physiol*. 2016;7:504.
- de Brito Alves JL, Costa-Silva JH. Maternal protein malnutrition induced-hypertension: new evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;45:422–9.
- de Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti-Neto MP, Leopoldino MA, Curi C, Colombini DSA, et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J Nutr*. 2015;145:907–14.
- Costa-Silva JH, de Brito-Alves JL, Barros MA, Nogueira VO, Paulino-Silva KM, de Oliveira-Lim A, et al. New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. *Front Physiol*. 2015;6:345.
- Paulino-Silva KM, Costa-Silva JH. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. *Clin Exp Pharmacol & Physiol*. 2016;43:1046–53.
- Elton ES, Zhang T, Prabhakar R, Arif AM, Berreau LM. Pb(II)-promoted amide cleavage: mechanistic comparison to a Zn(II) analogue. *Inorg Chem*. 2013;52:11480–92.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombini E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol*. 2006;572(Pt 2):503–23.
- Basting TM, Abe C, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. Is plasticity within the retrotrapezoid nucleus responsible for the recovery of the PCO₂ set-point after carotid body denervation in rats? *J Physiol*. 2016;594:3371–90.
- Guyenet PG. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol*. 2014;4:1511–62.
- Guyenet PG, Abbott SB, Stornetta RL. The respiratory chemoreception command: light at the end of the tunnel? *Brain Res*. 2013;1511:126–37.
- Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, et al. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci*. 2010;30:12466–73.
- Gonzalez C, Almazan L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994;74:829–98.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:239–66.

18. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol*. 2008;586:3253–65.
19. Costa-Silva JH, Silva PA, Pedit N, Luzardo R, Einicker-Lamas M, Lara LS, et al. Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur J Nutr*. 2009;48:437–45.
20. Prabhakar NR, Peng YJ, Kumar GK, Nanduri J. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr Physiol*. 2015;5:561–77.
21. Iturriaga R, Andrade DC, Del Rio R. Enhanced carotid body chemosensory activity and the cardiovascular alterations induced by intermittent hypoxia. *Front Physiol*. 2014;5:468.
22. da Silva GS, Giusti H, Benedetti M, Dias MB, Gargaglioni JH, Branco LG, et al. Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. *Pflügers Arch*. 2011;462:407–18.
23. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, et al. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun*. 2013;4:2395.
24. Marcus NJ, Del Rio R, Schultz EP, Xia XH, Schultz HD. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J Physiol*. 2014;592(Pt 2):391–408.
25. Narkiewicz K, Ratcliffe LJ, Hart EC, Briant LJ, Chrostowska M, Wolf J, et al. Unilateral carotid body resection in resistant hypertension: a safety and feasibility trial. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:313–24.
26. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939–51.
27. Bartlett D Jr, Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol*. 1970;10:384–95.
28. Franchini KG, Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst*. 1993;42:63–9.
29. Queiroz JC, Antonioli AR, Quintans-Junior LJ, Brito RG, Barreto RS, Costa EV, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of *Xylopia levigata* in experimental models. *Sci World J*. 2014;2014:816450.
30. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods*. 1985;13:139–43.
31. Nascimento SS, Araújo AA, Brito RG, Semfina MR, Menezes PP, DeSantana JM, et al. Cycloextrin-complexed *Ocimum basilicum* leaves essential oil increases Fos protein expression in the central nervous system and produce an antihyperalgesic effect in animal models for fibromyalgia. *Int J Mol Sci*. 2014;16:547–63.
32. Duvila J, Laws MJ, Kannan A, Li Q, Taylor RN, Bagchi MK, et al. Rac1 regulates endometrial secretory function to control placental development. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005458.
33. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991;84:482–92.
34. Bernardi L, Porta C, Gabutti A, Spicuzza L, Sleight P. Modulatory effects of respiration. *Auton Neurosci*. 2001;90:47–56.
35. Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol*. 2009;94:972–83.
36. Tezini GC, Dias DP, Souza HC. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. *Exp Gerontol*. 2013;48:147–53.
37. Iturriaga R, Del Rio R, Idiaquez J, Somers VK. Carotid body chemoreceptors, sympathetic neural activation, and cardiometabolic disease. *Biol Res*. 2016;49:13.
38. Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol*. 2013;591:2245–57.
39. de Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti Neto MP, Leopoldino AM, Curti C, Colombari DS, et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J Nutr*. 2015;145:907–14.
40. Prabhakar NR. Carotid body chemoreflex: a driver of autonomic abnormalities in sleep apnea. *Exp Physiol*. 2016;101:975–85.
41. Paton JF, Ratcliffe LJ, Hering D, Wolf J, Sobotka PA, Narkiewicz K. Revelations about carotid body function through its pathological role in resistant hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15:273–80.
42. Barnett S, Mulligan E, Wagerle LC, Lahiri S. Measurement of carotid body blood flow in cats by use of radioactive microspheres. *J Appl Physiol* (1985). 1988;65:2484–9. Epub1988/12/01.
43. Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LJ, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, et al. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med*. 2016;22:1151–9.
44. Svitek P, Molcan L, Stebelova K, Vesela A, Sedlackova N, Ujhazy E, et al. Prenatal hypoxia in rats increased blood pressure and sympathetic drive of the adult offspring. *Hypertens Res*. 2016;39:501–5.
45. Tan ZY, Lu Y, White CA, Simms AE, Paton JF, Chapleau MW, et al. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. *Circ Res*. 2010;106:536–45.
46. Paton JF, Sobotka PA, Pudim M, Engelman ZJ, Hart EC, McBryde FD, et al. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension*. 2013;61:5–13.
47. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Pudim M, et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol*. 2012;590:4269–77.
48. Sinski M, Lewandowski J, Przybylski J, Bidnik J, Abramczyk P, Ciarka A, et al. Tonic activity of carotid body chemoreceptors contributes to the increased sympathetic drive in essential hypertension. *Hypertens Res*. 2012;35:487–91.
49. Niewinski P, Janczak D, Racinski A, Tubek S, Engelman ZJ, Piesiak P, et al. Carotid body resection for sympathetic modulation in systolic heart failure: results from first-in-man study. *Eur J Heart Fail*. 2017;19:391–400.
50. Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, et al. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci*. 2003;23:11315–21.
51. Buttigieg J, Nune CA. Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:82–7.
52. Conde SV, Monteiro EC. Hypoxia induces adenosine release from the rat carotid body. *J Neurochem*. 2004;89:1148–56.
53. Conde SV, Monteiro EC, Rigual R, Obeso A, Gonzalez C. Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112:2002–10.
54. Housley GD, Martin-Body RL, Dawson NJ, Sinclair JD. Brain stem projections of the glossopharyngeal nerve and its carotid sinus branch in the rat. *Neuroscience*. 1987;22:237–50.

55. Dumpney RA. The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Prog Neurobiol.* 1994;42:197–227.
56. Sun MK. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog Neurobiol.* 1995;47:157–233.
57. Guyenet PG, Bayliss DA, Mulkey DK, Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AT. The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *Adv Exp Med Biol.* 2008;605:327–32.
58. Takakura AC, Moreira TS. The retrotrapezoid nucleus as a central brainstem area for central and peripheral chemoreceptor interactions. *Exp Physiol.* 2016;101:455–6.
59. Todd JL, Goldstein DB, Ge D, Christie J, Palmer SM. The state of genome-wide association studies in pulmonary disease: a new perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:873–80.
60. Zana-Taieb E, Pham H, Franco-Montoya ML, Jacques S, Letourneur F, Baud O, et al. Impaired alveolarization and intrauterine growth restriction in rats: a postnatal genome-wide analysis. *J Pathol.* 2015;235:420–30.
61. Ding YX, Cui H. Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression data provide a regulatory network in intrauterine growth restriction. *Life Sci.* 2017;179:60–5.
62. Thompson RF, Pazzari MJ, Niu H, Barzilai N, Simmons RA, Grealley JM. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem.* 2010;285:15111–8.
63. Wang Y, O'Connell JR, McAnille PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, et al. From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:226–31.
64. Shi R, Li J, He J, Meng Q, Qian Z, Shi D, et al. Association of with-no-lysine kinase 1 and Serine/Threonine kinase 39 gene polymorphisms and haplotypes with essential hypertension in Tibetans. *Environ Mol Mutagen.* 2018;59:151–60.
65. Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet.* 2009;18:2288–96.
66. Oliveira-Sales EB, Colombani DS, Duvisson RL, Kasparov S, Hirata AE, Campos RR, et al. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension.* 2010;56:290–6.
67. Wallbach M, Koziolek MJ. Baroreceptor in the carotid and hypertension-systematic review and meta-analysis of the effects of baroreflex activation therapy on blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;33:1485–93.
68. Braga VA. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. *Auton Neurosci.* 2010;155:14–8.
69. Johansson S, Norman M, Legnevall L, Dalmaz Y, Lagercrantz H, Vanpey M. Increased catecholamines and heart rate in children with low birth weight: perinatal contributions to sympathoadrenal overactivity. *J Intern Med Suppl.* 2007;261:480–7.
70. Carthy ER. Autonomic dysfunction in essential hypertension: a systematic review. *Ann Med Surg.* 2014;3:2–7.
71. Kanbar R, Chapuis B, Orea V, Barros C, Julien C. Baroreflex control of lumbar and renal sympathetic nerve activity in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295: R8–R14.



**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, 25 de fevereiro de 2015.

Ofício nº 14/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. João Henrique da Costa Silva**
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.062778/2014-38

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 dos efeitos funcionais e moleculares induzidos pela desnutrição protéica e atividade física materna sobre o controle da atividade nervosa simpática e ventilação de ratos jovens**".

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - CCS/UFPE; Animais: ratos isogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 30 dias; Peso: 100g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 90.

Prof. Dr. Pedro V. Carrelli
Prof. Dr. Pedro V. Carrelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver