



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO - PPGN

LUANA D'ARC SILVA DE ANDRADE

**ATIVIDADE FÍSICA MATERNA VOLUNTÁRIA ATENUA AS MODIFICAÇÕES
RESPIRATÓRIAS E BIOQUÍMICAS DA PROLE DE RATOS PROVENIENTES DE
MÃES SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Recife

2019

LUANA D'ARC SILVA DE ANDRADE

**ATIVIDADE FÍSICA MATERNA VOLUNTÁRIA ATENUA AS MODIFICAÇÕES
RESPIRATÓRIAS E BIOQUÍMICAS DA PROLE DE RATOS PROVENIENTES DE
MÃES SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

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

Área de concentração: Bases experimentais da Nutrição.

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

Coorientadores: Profº Drº Danilo Augusto Ferreira Fontes

Profª Drª Viviane de Oliveira Nogueira Souza

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4: 1790

A553a	<p>Andrade, Luana D'arc Silva de</p> <p>Atividade física materna voluntária atenua as modificações respiratórias e bioquímicas da prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal/ Luana D'arc Silva de Andrade. – 2019.</p> <p>91 f.; il.</p> <p>Orientador: João Henrique da Costa Silva.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição. Recife, 2019.</p> <p>Inclui referências e apêndices.</p> <p>1. Deficiência de proteína. 2. Qualidade de Vida. 3. Ventilação. 4. Pressão arterial. I. Silva, João Henrique da Costa (orientador). II. Título.</p> <p>612.3 CDD (23.ed.)</p>	UFPE (CCS 2019 - 241)
-------	--	-----------------------

LUANA D'ARC SILVA DE ANDRADE

**ATIVIDADE FÍSICA MATERNA VOLUNTÁRIA ATENUA AS MODIFICAÇÕES
RESPIRATÓRIAS E BIOQUÍMICAS DA PROLE DE RATOS PROVENIENTES DE
MÃES SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

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

Aprovada em: 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Carol Virgínia Góis Leandro (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco - Centro Vitória

Prof^o Dr^o David Filipe de Santana (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro Vitória

Prof^a Dra . Monique Assis de Vasconcelos (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro Vitória

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me possibilitado estar firme durante toda essa trajetória, por esse caminho de muita luta, porém com bastante vitórias, pois o Senhor esteve sempre comigo, sendo o meu diferencial!

Ao Grupo de oração **Santíssima Trindade**, ao qual sou consagrada, pois foi lá que aprendi o valor da minha fé, onde aprendi a refletir, duvidar e nunca encarar a realidade como pronta. Foi lá onde aprendi a ver a vida de um jeito diferente, de um jeito sobrenatural.

Ao meu pai, **PAULO ANDRADE** (*in memoriam*), um grande professor de matemática que plantou em mim o desejo pelo estudo. Por todo cuidado e carinho em me ensinar a ler, escrever, a contar, dividir, multiplicar, pelos cadernos de caligrafias NAS FÉRIAS, e por me ensinar que podem me tirar tudo, menos aquilo que aprendi. E de onde o senhor estiver, pode se encher de orgulho, que essa vitória foi de um fruto seu.

A minha família, obrigada pelo apoio, carinho e compreensão. Essa vitória não é só minha, é nossa!

Ao meu orientador Prof. Dr. **João Henrique**, pela oportunidade e confiança dada, sou muito grata a Deus por ter colocado o senhor no meu caminho, tenho e sempre tive muito orgulho em tê-lo como meu orientador, você é um professor brilhante, lhe admiro demais, e nunca vou esquecer que se estou aqui hoje foi porque o senhor me orientou para este caminho. Enfim, obrigada pela sua atenção, paciência, inteligência, ética e ensinamentos valiosos para minha vida profissional.

Aos meus co-orientadores **Danilo Fontes** e **Viviane Nogueira** que me acolheram e me ajudaram, pelo tempo dedicado a me orientar e pelas contrições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica, **Aninha, Palloma, Regi, Vivi, Ially, Aline, Débora, Nique, Thais,**

Rayssa, Danilo, vocês são demais pessoal, foi muito bom partilhar tantas coisas boas (e difíceis também) com vocês. Obrigada pelos momentos de alegria, de desespero kk se com vocês já foi difícil imaginem sem. Obrigada pela equipe que fomos. Nunca deixem de ser equipe, pois o trabalho em equipe é mais rico, forte, sozinhos vencemos às vezes, mas em equipe podemos ganhar constantemente! Ah, precisando já sabem né?!

Ao meu noivo, **Jordhan Cavalcanti**, por ser esse homem de Deus e compreensivo, que sempre me apoiou em tudo.

E por fim, agradeço ao mundo por mudar as coisas e por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois, assim, não teríamos o que pesquisar.

RESUMO

A desnutrição proteica perinatal é capaz de promover alterações respiratórias na prole. Modelos experimentais de atividade física voluntária materna (AFV) em cicloergômetro antes e durante a gestação parecem atenuar os efeitos da desnutrição. O objetivo do trabalho foi avaliar as modificações respiratórias e bioquímicas da prole de ratos (N=48) provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal. Para isso, foram utilizados ratos Wistar (n=48) provenientes de mães que antes da gestação foram colocadas individualmente nas gaiolas de AFV por um período de adaptação de 30 dias. Após esse período as ratas foram classificadas de acordo com o nível de atividade física diária: Inativo ou Ativo. A partir desse momento, as ratas foram colocadas para acasalar e a partir do primeiro dia de prenhez receberam dieta normoproteica (NP, 17% de proteína) ou hipoproteica (HP, 8% de proteína) obtendo-se os grupos NP, NP ativo, NP inativo, HP, HP ativo e HP inativo. No 1º, 5º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida, por pletismografia de corpo inteiro, foi avaliado na prole a frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE). Ao 21º e 30º dia os animais passaram por jejum de 12 horas para posterior realização da coleta de sangue para realização das análises bioquímicas dos níveis de albumina, proteínas totais, triglicerídeo, colesterol total e glicose. No 30º dia foi realizado o procedimento para implante dos cateteres na artéria femoral, para posterior registro da pressão arterial. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Após as análises ventilatórias foi observado que os animais HP inativo apresentaram uma diminuição da FR no 1º, 7º e 14º dia de vida, além de apresentarem um aumento dessa FR ao 30º dia de vida, o qual não foi observado no grupo NP e na prole proveniente de mães HP Ativas. Foi possível observar aos 22 dias que o grupo HP inativo mostraram uma redução nos níveis de proteínas, albumina, triglicerídeos e colesterol e um aumento nos níveis de glicose quando comparados com o grupo NP. Aos 30 dias de vida os animais HP permaneceram com uma diminuição nos níveis séricos de proteínas e albumina e começaram a apresentar um aumento de triglicerídeos quando comparados com o

grupo NP. Em relação aos parâmetros cardiovasculares observou-se que nesta idade a desnutrição e atividade física não foram capazes de influenciar na pressão arterial dos animais. Neste sentido, a atividade física voluntária materna parece atenuar os efeitos causados pela desnutrição sobre os parâmetros respiratórios e bioquímicos.

Palavras-chave: Deficiência de proteína. Qualidade de Vida .Ventilação. Pressão arterial.

ABSTRACT

Perinatal protein malnutrition is capable of promoting respiratory changes in the offspring. Experimental models of voluntary maternal physical activity (AFV) on a cycle ergometer before and during gestation seems to attenuate the effects of malnutrition. The objective of this study was to evaluate the respiratory and biochemical changes of the offspring of rats (N=48) from mothers submitted to perinatal protein malnutrition. After this period the rats were classified according to the level of daily physical activity: Inactive or Active. From that moment, the rats were placed to mate and from the first day of pregnancy received a normoprotein (NP, 17% protein) or lowprotein (LP, 8% protein) diet. In the 1st, 5th, 7th, 14th, 21st and 30th days of life, plethysmography of the whole body was evaluated in the offspring respiratory rate (RR), tidal volume (VT) and pulmonary ventilation (LV). On the 21st and 30th days, the animals were fasted for 12 hours and the blood was collected for biochemical analyzes of Albumin, Total Proteins, Triglycerides, Total Cholesterol and Glucose. On the 30th day, the procedure for implanting the catheters in the femoral artery was carried out, in order to record blood pressure. The results were expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA and $p < 0.05$ were used. All procedures were approved by CEUA / UFPE (23076.021679 / 2015-87). After the ventilatory analysis it was observed that the inactive LP animals presented a decrease in the FR at the 1st, 7th and 14th day of life, besides showing an increase of this FR at the 30th day of life, which is not observed in the NP group and offspring from active LP mothers. It was observed at 22 days that the inactive LP group showed a reduction in the levels of proteins, albumin, triglycerides and cholesterol and an increase in glucose levels when compared with the NP group. At 30 days of age the LP animals remained with a decrease in the serum levels of proteins and albumin and began to present an increase of triglycerides when compared with the NP group. Regarding cardiovascular parameters, it was observed that at this age malnutrition and physical activity are not able to influence this parameter. In this sense, voluntary maternal

physical activity seems to attenuate the effects caused by malnutrition on respiratory and biochemical parameters.

Keywords: Protein Deficiency.Quality of life.Ventilation.
Blood Pressure.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Gaiola de atividade física voluntária	33
FIGURA 2 -	Gráfico dos parâmetros respiratórios	40
FIGURA 3 -	Gráfico dos parâmetros cardíacos	42
FIGURA 4 -	Gráfico de correlação entre nível de atividade física voluntária materna e frequência respiratória da prole	43
FIGURA 5 -	Gráfico de correlação entre nível de atividade física voluntária materna e volume corrente (VT) da prole	45
FIGURA 6 -	Gráfico de correlação entre nível de atividade física voluntária materna e ventilação pulmonar (VE) da prole	46
FIGURA 7 -	Gráfico de correlação entre nível de atividade física voluntária materna e parâmetros bioquímicos da prole	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Composição nutricional das dietas (g/100g de dieta)	
.....		30
TABELA 2 -	Classificação dos grupos experimentais de acordo com a atividade física diária (distância percorrida, gasto calórico e tempo de atividade) no cicloergômetro	
.....		32
TABELA 3 -	Parâmetros bioquímicos séricos ao 22º dia de vida	
.....		37
TABELA 4 -	Parâmetros bioquímicos séricos ao 30º dia de vida	
.....		38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFV	Atividade Física Voluntária
AIN	Do inglês, <i>American Institute of Nutrition</i>
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CEUA	Comitê de Ética em Utilização Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNT	Doenças Não Transmissíveis
EPM	Erro Padrão da Média
FR	Frequência Respiratória
FC	Frequência Cardíaca
GAFV	Gaiola de Atividade Física Voluntária
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HP	Hipoproteico
NP	Normoprotéico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PA	Pressão Arterial
PVA	Pressão de vapor d'água à temperatura da câmara
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PB	Pressão barométrica
PC	Pressão de vapor d'água à temperatura corporal
PT	Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente
PK	Deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TA	Temperatura do ar dentro da câmara
Tamb	Temperatura ambiente
TC	Temperatura Corporal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VE	Ventilação
VC	Volume Corrente
VK	Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Desnutrição e o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas.	18
2.2	Alterações cardiovasculares com origem no ambiente intrauterino ..	22
2.3	Atividade Física	24
3	JUSTIFICATIVA	27
4	HIPÓTESE	28
5	OBJETIVOS	29
5.1	Objetivo Geral	29
5.2	Objetivos Específicos	29
6	METODOLOGIA	30
6.1	Animais	30
6.2	Dietas e Indução da Desnutrição Proteica	30
6.3	Protocolo de atividade física voluntária	31
6.4	Procedimento cirúrgico para implante do cateter arterial	33
6.5	Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca	33
6.6	Medidas ventilatórias	34
6.7	Análise Bioquímica do soro	34
6.8	Análise dos dados	35
7	RESULTADOS	36
7.1	Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros bioquímico.....	36

7.2	Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros ventilatórios	39
7.3	Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros cardiovasculares.....	41
7.4	Correlação entre atividade física voluntária materna e parâmetros respiratórios	43
7.5	Correlação entre atividade física voluntária materna e parâmetros bioquímicos	47
8	DISCUSSÃO	50
9	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL	70

1 INTRODUÇÃO

A gestação, lactação e primeira infância são períodos em que ocorrem rápida proliferação e diferenciação celular, bem como maturação de órgãos e sistemas, momento este denominado de período crítico de desenvolvimento (MORGANE et al., 1993). Cada sistema fisiológico possui seu próprio período crítico que pode variar entre as espécies, sendo possível observar situações em que a deficiência nutricional durante esses períodos poderá acarretar prejuízos ao processo de crescimento e desenvolvimento do feto, culminando com o aparecimento de doenças na vida adulta, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade (LUCAS, 1991; DIAS *et al.*, 2004; CALKINS; DEVASKAR, 2011). Este fenômeno é denominado de 'Plasticidade Fenotípica' e refere-se à propriedade de um determinado genótipo originar diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais (WEST- EBERHARD, 1986; HANSON *et al.*, 2011).

Uma alimentação adequada, principalmente durante estes períodos críticos de desenvolvimento, é indispensável para um adequado crescimento e desenvolvimento do feto, sabendo que nestes períodos há maior suscetibilidade a estímulos ambientais gerando respostas adaptativas que repercutem em alterações capazes de predispor os indivíduos ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (HANSON e GLUCKMAN, 2011). Dentre essas doenças, a hipertensão é um fator de risco altamente prevalente e significativo para o desenvolvimento de doença metabólica, incluindo doença cardíaca coronariana (CHD), acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, da aorta, e doença arterial periférica. A etiologia da hipertensão inclui um fenótipo complexo que surge a partir de numerosas origens genéticas, ambientais, comportamentais, e até mesmo sociais (LANDSBERG et al., [2013](#); SBC, 2017).

A fim de estudar os principais efeitos sobre o sistema cardiovascular, ocasionados por uma baixa ingestão de proteínas durante esses períodos críticos do desenvolvimento alguns modelos de desnutrição experimental vem sido utilizados (LUZARDO et al., 2011; [DE BRITO ALVES et al., 2015](#); [COSTA-SILVA et al., 2015](#)). Recentemente, estudos do nosso laboratório têm verificado que ratos, provenientes

de mães que receberam dieta hipoproteica (8% de proteína) durante o período perinatal (gestação e lactação) apresentam na vida adulta (90 dias de vida) um aumento de pressão arterial, assim como apresentam alterações no ritmo respiratório aos 30 e 90 dias de vida (DE BRITO ALVES et al., 2015; [COSTA-SILVA et al., 2016](#)). Além disso, estudos *in situ*, do nosso grupo de pesquisa, têm demonstrado que esses animais, aos 90 dias de vida, apresentam um aumento nos níveis de atividade nervosa simpática (BRITO ALVES et al., 2015). Sabe-se que uma das principais causas para o desenvolvimento da hipertensão arterial tem sido uma hiperatividade do sistema nervoso simpático (DE BRITO ALVES et al., 2014), o que, segundo alguns estudos, sugerem que este aumento na atividade nervosa simpática e respiratória associada a uma maior sensibilidade de quimiorreceptores pode predispor o desenvolvimento de hipertensão (GUYENET et al., 1990; SMITH et al., 1991; GUYENET, 2006; ZOCCAL et al., 2009; COSTA-SILVA et al., 2010; PATON et al., 2013). Em contra partida, estudos têm relatado os benefícios da prática de atividade física antes e 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 e WEISSGERBER, 2003; CLAPP, 2008).

Estudos experimentais com 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 et al., 2012). A prática da atividade física antes e durante a gestação é caracterizada por causar adaptações fisiológicas que atuam como reguladores crônicos e agudos da disponibilidade de oxigênio e de substrato para mãe e filho. Porém, o efeito do exercício sobre o feto é dependente do tipo, frequência, intensidade e duração do exercício, e do tempo de gravidez em que o exercício é realizado (CLAPP, 2002; [CLAPP et al., 2003](#); [MUNIZ, et al., 2014](#); [FRAGOSO et al., 2017](#)). A atividade física voluntária materna em cicloergômetro, antes e durante a gestação, parece ter um efeito atenuador sobre as alterações induzidas pela desnutrição proteica, a exemplo da trajetória de crescimento e ontogênese reflexa da prole (MUNIZ, 2014).

Nesse sentido, informações sobre o efeito da atividade física voluntária materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios da prole de mães desnutridas precisam ser compreendidas visando estabelecer estratégias não-farmacológicas de prevenção da hipertensão arterial. Além disso, propomos determinar se as mudanças fisiológicas induzidas pela atividade física atenuam os efeitos causados pela desnutrição sobre a prevenção ou estabelecimento das doenças cardiorrespiratórias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desnutrição e o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas

Mudanças no padrão alimentar têm demonstrado ser um importante fator subjacente para o aumento da prevalência de doenças não transmissíveis (WELLS, 2018), principalmente nos países em desenvolvimento (BISHWAJIT, 2015). As Doenças Não Transmissíveis (DNT) são responsáveis por uma mortalidade significativa (cerca de 38 milhões de mortes por ano) em todo o mundo, dos quais maioria dessas mortes (28 milhões) ocorre em países de baixa e média renda (THIPPESWAMY, 2016). Nas últimas décadas, tem sido registrado um grande aumento da prevalência de obesidade, diabetes tipo II, hipertensão, dislipidemias e outras doenças metabólicas (WIJNHOFEN *et al.* 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 2014, em média três milhões de pessoas, em grande parte crianças, morrem anualmente por problemas relacionados à desnutrição e modificações no ambiente perinatal. No Brasil, os percentuais de crianças com baixo peso até os cinco anos tem diminuído, entretanto, ainda é superior aos dos países considerados desenvolvidos (WHO, 2008). Acredita-se que esta deficiência nutricional que leva ao baixo peso é um dos principais determinantes da mortalidade e morbidade infantil. Estudos realizados no Brasil, (BATISTA-FILHO *et al.*, 1971; TEODÓSIO *et al.*, 1990; COSTA, 1995; MEDEIROS *et al.*, 2008), têm demonstrado relação entre a deficiência nutricional no período perinatal e o desenvolvimento de doenças na vida adulta (SICHERI *et al.*, 1993; SAWAYA *et al.*, 1995; SAWAYA *et al.*, 2003; SALDIVA *et al.*, 2004). Neste sentido, acredita-se que todas as células do organismo, em maior ou menor intensidade, sofrem alterações provocadas pela desnutrição proteica, e ao que parece, quanto mais precoce essa desnutrição for imposta, maior será o comprometimento do funcionamento dos órgãos (PENITENTE *et al.*, 2007).

Dessa forma, uma alimentação balanceada é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento do organismo. A falta ou a deficiência de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, durante a gestação e a lactação, tem repercussões a curto e longo prazo (LEANDRO *et al.*,

2009; SAID et al, 2018). Barker et al (2007), relata que a nutrição materna inadequada, em particular, tem sido implicada como um importante determinante do risco para o desenvolvimento posterior de hipertensão na prole. Dessa forma, uma vez reconhecido o papel dos nutrientes no crescimento e desenvolvimento, o estado nutricional de indivíduos, especialmente a desnutrição, se tornou alvo dos estudos (OZANNE, JENSEN et al. 2005; GAO et al, 2014; [DE BRITO ALVES et al., 2015](#); LIU et al. 2018).

A disponibilidade inadequada de nutrientes e/ou oxigênio para o feto, quando ocasionados por fatores ambientais, como a desnutrição materna ou fluxo sanguíneo deficiente, frequentemente resulta em restrição de crescimento intrauterino (ROMO et al, 2009). Restrição de crescimento intrauterino está associada a maiores taxas de morbidade e de mortalidade perinatal, bem como consequências em longo prazo, tais como obesidade, doença cardiovascular ou de diabetes tipo II em populações humanas (SALAM et al, 2014).

Estudos experimentais em ratos mostraram que dietas de baixa proteína isocalóricas administradas ao longo da gestação induziram alterações no peso e morfologia placentária (REBELATO, 2013). Em 2015, Naik e colaboradores observaram que a desnutrição proteica durante o período pré-gestacional, gestacional e vida pós-natal induziu efeitos deletérios com retardos fisiológicos caracterizado por restrição de peso corporal e atrasos do desenvolvimento neurológico em filhotes. Neste sentido, é importante ressaltar que os efeitos ambientais podem interagir com determinantes genéticos que afetam a vida útil, de maneira que não podem ser compreendidos considerando os fatores genéticos ou ambientais, separados (FLATT, 2013).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo e um dos principais fatores desencadeadores de doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos (HALES e BARKER, 1992; RAVELLI et al., 1998; RAVELLI et al., 1999), e experimentais (JOHNSON, et al., 2008; [COSTA-SILVA et al., 2015](#); [COSTA-SILVA et al., 2016](#)), tem demonstrado que o consumo deficiente de proteínas durante os períodos críticos do desenvolvimento humano (gestação e/ou lactação) é capaz de induzir o surgimento de HAS na vida adulta.

Essa relação entre desnutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na vida adulta é suportada pela hipótese da plasticidade fenotípica, onde insultos ambientais ocorridos durante a gestação e/ou lactação podem predispor alterações morfológicas e fisiológicas, culminando em doenças na vida adulta, tal como a HAS (BARKER, 1986; BARKER, 2007). Esse aumento dos níveis pressóricos na vida adulta tem sido bastante documentado em diferentes modelos de desnutrição perinatal, durante ambos os períodos, gestação e lactação (BARROS, 2015; ALVES, 2012) ou até durante o período pós-natal.

Sabe-se que a relação entre ambiente materno e o desenvolvimento fetal tem sido advogado como um dos precursores para o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta. Essa relação entre insultos ambientais no início da vida e suas repercussões ao longo da vida pode ser explicada pelo fenômeno biológico chamado de plasticidade fenotípica (WESTEBERHARD, 1989).

Entende-se por plasticidade fenotípica a capacidade de um organismo alterar sua morfologia e fisiologia de acordo com o ambiente, habilidade de um genótipo de produzir mais de um fenótipo quando exposto a ambientes diferentes (WESTEBERHARD, 1986). Existem períodos específicos do desenvolvimento em que um organismo é "plástico" ou "sensível" ao seu ambiente (CALKINS; DEVASKAR, 2011). Esse período é denominado por janela crítica (período sensível), o período durante o desenvolvimento quando o fenótipo de um organismo é sensível a fatores intrínsecos (genéticos) ou extrínsecos (ambientais). Tais janelas representam uma forma de plasticidade fenotípica de desenvolvimento e resultado da interação entre genótipo e ambiente (BURGGREN; MUELLER, 2015).

Nos anos 1960, Neel lançou a "hipótese do genótipo poupador", propondo que determinadas populações apresentavam maior propensão à resistência insulínica, tanto por seleção quanto por aspectos genéticos. Segundo esse autor, uma mutação aleatória levando à resistência à insulina poderia ser adaptativa e benéfica para indivíduos expostos a ambiente com escassez alimentar, originando seleção natural desses indivíduos, com a consequente transmissão do caráter para as gerações seguintes. Em 1989, Barker *et al.* desenvolveram a hipótese de que condições adversas intrauterinas e durante a infância aumentavam o risco de

doenças cardiovasculares. Essas observações geraram a “hipótese do fenótipo poupador” (thrifty phenotype hypothesis), a qual propõe que o feto é capaz de se adaptar a um ambiente intrauterino adverso otimizando o uso de suprimentos energéticos reduzidos, no sentido de garantir sua sobrevivência (HALES E BARKER, 1992). Entretanto, esse processo adaptativo poderia levar ao favorecimento metabólico de órgãos nobres em detrimento de outros, conferindo alterações persistentes no crescimento e função dos tecidos. No mesmo período, um grupo independente de pesquisadores concentrou-se no estudo dos efeitos da dieta utilizada por recém-nascidos pré-termo sobre diferentes desfechos tardios. Esses autores demonstraram, através de estudos clínicos, a influência dos diferentes tipos de dieta láctea sobre o crescimento somático, imune e o desenvolvimento neuropsicomotor, propondo o uso do termo “programação” (LUCAS, 1990; 1998).

O conceito de “*programação de desenvolvimento*” propõe que os desafios durante o desenvolvimento de um organismo evoca uma resposta fisiológica persistente na prole. As investigações epidemiológicas, tais como as realizadas nas crianças concebidas durante a fome holandesa de 1944-1945 destacaram a associação entre a nutrição materna deficiente, peso ao nascimento reduzido e doenças na vida adulta (RAVELLI *et al.*, 1999, ROSEBOOM, 2001). Uma das mudanças mais bem documentadas no estudo da plasticidade fenotípica é a nutrição (WEST; EBERHARD, 1986).

Os estudos com animais utilizando manipulações dietéticas durante o período perinatal têm apontado plausíveis respostas fenotípicas. Em alguns modelos experimentais bem estabelecidos, por exemplo, ratos são submetidos à dietas hipoprotéicas (5 – 9% caseína) ou restrição alimentar (30 – 70% de redução da dieta oferecida ao controle) durante a gestação e/ou lactação (OZANNE, JENSEN *et al.* 2005; KUMON, YAMAMOTO *et al.* 2010; LANGLEY-EVANS, DANIEL *et al.* 2011).

O mecanismo sugerido para as respostas fenotípicas envolve aspecto epigenético, neste caso um fator externo levaria a alterações adaptativas na expressão gênica de proteínas em células e tecidos, levando a mudanças na sua fisiologia (BARKER, 2007; WELLS, 2010; HANSON e GLUCKMAN, 2011). Estes

mecanismos incluem a metilação e acetilação do DNA, e modificações nas histonas (Hahn, Dambacher et al. 2010). Assim, os estímulos ambientais são capazes de conduzir o organismo ao seu ambiente esperado na vida adulta, além do que seria possível através do genótipo herdado (Bateson, Barker et al. 2004).

2.2 Alterações cardiovasculares com origem no ambiente intrauterino

Sabe-se que etiologia da hipertensão arterial é multifatorial e inclui um fenótipo complexo que surge de origens genéticas, ambientais, nutricionais, comportamentais e étnicas que podem favorecer o seu desenvolvimento e ao que parece sua origem tem forte ligação com o ambiente fetal e pós-natal inicial (LANDSBERG et al., [2013](#); NG et al., [2014](#)). A correlação entre condições intrauterinas adversas e distúrbios cardiovasculares subsequentes foi proposta pela primeira vez por Barker, que relatou uma ligação entre a taxa de mortalidade da doença arterial coronariana e o peso ao nascer (BARKER et al., 1990; BARKER., 1998). Barker formulou a hipótese de que respostas adaptativas a um insulto ambiental no início da vida podem persistir e se tornar prejudiciais durante a vida adulta, quando o insulto não estiver mais presente.

Estudos prévios têm evidenciado que aqueles nascidos com baixo ou alto peso ao nascer apresentam comprometimento do sistema vascular arterial com modificações tanto funcionais (disfunção do endotélio, redução da produção de óxido nítrico) quanto estruturais / mecânicas (deficiência de síntese de elastina, aumento da rigidez arterial) (MARTIN et al., 2000; FRANCO et al., 2006; SKILTON et al., 2014), além de alterações no controle autonômico (SOUZA et al., 2017).

Além disso, está bem estabelecido que os estímulos ambientais da desnutrição perinatal, como a redução no conteúdo de proteínas na dieta durante a gestação, lactação ou após o desmame, podem contribuir para a programação de riscos subsequentes de hipertensão por mecanismos que incluem morfologia e função reduzida dos néfrons, redução da taxa de filtração glomerular e disfunção no sistema renina-angiotensina-aldosterona (NUYT e ALEXANDER, [2009](#); COSTA-SILVA et al., 2009; MESQUITA et al., 2010; LUZARDO et al., 2011).

Estudos *in situ* do nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a prole de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal, apresentam aos 30 dias de vida

um aumento nos níveis de atividade nervosa simpática torácica e aumento na amplitude de disparo do nervo frênico, demonstrando uma associação entre a atividade simpática e as alterações respiratórias (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2016). Esses resultados demonstram que a prole de ratos provenientes de mães desnutridas apresentam hiperatividade simpática desde o início da vida e que isso pode ser um dos fatores que contribuem para o aumento de pressão arterial aos 90 dias de vida.

Sabemos que o sistema nervoso simpático é capaz de aumentar a atividade cardiovascular, desta forma, a estimulação simpática é capaz de promover o aumento da atividade cardiorrespiratória (IRIGOYEN *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2009). Neste sentido, uma das principais causas apontadas para o desenvolvimento da hipertensão é a hiperatividade do sistema nervoso simpático (CZYZYK-KRZESKA E TRZEBSKI, 1990; SIMMS *et al.*, 2009; COSTA-SILVA, ZOCCAL e MACHADO, 2010).

Um dos mecanismos que podem promover a hiperatividade do sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, hipertensão arterial são as alterações na geração e modulação do ritmo respiratório e alterações na quimiossensibilidade respiratória ao O₂ e CO₂ (ZOCCAL *et al.*, 2008; COSTA-SILVA, ZOCCAL e MACHADO, 2010; MORAES *et al.*, 2014). Sugerindo que mecanismos respiratórios estão envolvidos no processo de instalação desta patologia. Estudos de Simms *et al.* (2009) demonstraram que modificações no padrão respiratório, especialmente, mudanças na quimiossensibilidade ao CO₂, estão envolvidos com a hiperatividade do sistema nervoso simpático e o aparecimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SIMMS *et al.*, 2009).

Já está bem descrito que neurônios localizados no Núcleo do Trato Solitário (NTS) e região rostral ventro-lateral do bulbo (RVLM) são responsáveis pela geração e modulação do ritmo respiratório (HASELTON; GUYENET, 1989; FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003) e seus circuitos neuronais funcionais tornam-se completamente desenvolvidos e maduros durante as primeiras semanas após o nascimento (MELLEN; THOBY-BRISSON, 2012). Tem sido demonstrado que o período crítico para maturação dos quimiorreceptores respiratórios ocorre também

após o nascimento (DARNALL, 2013; DE CARO *et al.*, 2013). No entanto, insultos nutricionais podem afetar a embriogênese e o processo de maturação morfo-funcional destes quimiorreceptores e predispor a prole a modificações ventilatórias a curto e longo prazo.

Estudos em nosso laboratório verificaram que ratos provenientes de mães que receberam dieta hipoproteica (8%) durante o período perinatal (gestação e lactação) apresentaram aos 30 dias de vida alterações no ritmo respiratório (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014) e desencadeiam aumento significativo nos níveis basais de pressão arterial a partir dos 90 dias de vida, o qual persiste na vida adulta do animal (BARROS *et al.*, 2014). Diante desses resultados, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a entender quais são os mecanismos envolvidos com essas alterações.

2.3 Atividade Física

O termo atividade física é caracterizado por qualquer movimento do músculo esquelético que demande gasto energético, podendo o indivíduo ser classificado como ativo ou inativo, a depender da quantidade de calorias semanais gastas em um esforço físico (PERKINS *et al.*, 2007). O termo exercício físico se refere a uma atividade física realizada sistematicamente. As adaptações fisiológicas associadas ao exercício físico dependem da intensidade, da duração e da frequência do esforço. Se esse exercício físico é realizado regularmente é denominado de treinamento físico (LEANDRO, 2007).

A atividade física é um importante componente de um estilo de vida saudável. Ultimamente, tem se tornado interessante mulheres grávidas realizarem atividade leve com duração e intensidade determinada, a fim de minimizar os riscos tanto fetais quanto maternos (PERKINS *et al.*, 2007; WASINSKI *et al.*, 2015). Estilo de vida materno modula várias adaptações fisiológicas maternas da gravidez envolvidas no crescimento feto-placentário através do reforço de nutrientes e disponibilidade de oxigênio para o feto ([CLAPP *et al.*, 2004](#)). No entanto, o conhecimento sobre as contribuições do exercício materno durante a gravidez e os efeitos sobre o fenótipo metabólico da prole não são bem compreendidos.

Não é recomendado realizar programas de exercícios de alta intensidade durante a gestação por estar relacionado com complicações na gravidez acarretando riscos potenciais para o feto, criando um estado de hipóxia para o mesmo, em situações em que haja risco de trauma abdominal e em situações de hipertermia da gestante. Esses fatores podem gerar estresse fetal, restrição de crescimento intrauterino e prematuridade. Porém o exercício moderado é benéfico para a mãe e o feto (LUMBERS, 2002; BENNELL, 2001). Diretrizes clínicas incentivam o exercício moderado durante a gravidez devido aos seus múltiplos efeitos benéficos tanto para a mãe quanto para o filho (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2009; MELZER, 2010).

A prática de exercício físico moderado materno durante a gravidez é caracterizada por causar uma redução aguda nos níveis de oxigênio, ocasionada devido a uma ligeira redistribuição do fluxo sanguíneo da placenta para os músculos em movimento 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 nutrientes para a placenta.

Assim, o efeito do exercício sobre o feto é dependente do tipo, frequência, intensidade, duração, e do tempo de gravidez em que o exercício é realizado (CLAPP, 2003). Dessa forma, a atividade física voluntária se apresenta em grande vantagem quando comparado aos treinamentos físicos forçados, por induzir menos estresse aos animais, diminuindo o risco na interpretação dos resultados (GARLAND *et al.*, 2011; CONTARTEZE *et al.*, 2008). Além disso, a atividade física regular de intensidade leve durante a gestação, devido ao aumento do fluxo de oxigênio e nutrientes para o feto, pode repercutir positivamente durante o desenvolvimento pós-natal (CLAPP *et al.*, 2002; PENG *et al.*, 2011; FRAGOSO *et al.*, 2017). Neste sentido, propõe-se que a atividade física voluntária materna em cicloergômetro antes e durante a gestação tenha um efeito atenuador na desnutrição proteica (MUNIZ *et al.*, 2014).

Recentemente, alguns estudos vêm demonstrando os benefícios da prática da atividade física voluntária materna na prole de ratos (MUNIZ *et al*, 2014; FRAGOSO *et al*, 2017). Estudo com ratos mostrou que atividade física voluntária materna em cicloergômetro antes e durante a gestação foi capaz de alterar parâmetros relacionados ao crescimento somático, como no aumento do comprimento corporal, comprimento da cauda e do eixo laterolateral da cabeça da prole (MUNIZ *et al.*, 2014). Outro estudo experimental demonstrou que filhotes de mães que foram submetidas à desnutrição durante a gestação e lactação mostraram nenhum atraso na ontogenia reflexa e apresentaram um desenvolvimento mais rápido dos padrões de atividade locomotora (FRAGOSO *et al.*, 2017). Neste sentido, esses estudos tem demonstrado que a atividade física voluntária da mãe foi capaz de atenuar os efeitos causados pela dieta hipoproteica sobre esses parâmetros.

Dessa forma, pesquisas adicionais utilizando modelo de atividade física voluntária em mães antes e durante a gestação são necessárias para determinar outros efeitos sobre as alterações causadas pela desnutrição proteica e os desfechos envolvidos no processo de plasticidade fenotípica.

3 JUSTIFICATIVA

Entender a relação entre desnutrição e hipertensão arterial é de fundamental importância mundial, sobretudo no entendimento de como os sistemas fisiológicos, como o cardiorrespiratório, se porta frente a alterações nutricionais que podem ocorrer ao longo da vida. Ainda, como e por quais mecanismos de ação estes efeitos agudos podem interferir na fisiologia e no desenvolvimento de doenças como a hipertensão arterial.

Neste contexto, neste trabalho ressalta-se a relevância em avaliar o papel modulador desempenhado pela atividade física materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e bioquímicos na prole de mães desnutridas, a fim de tentar descobrir se a atividade física materna é capaz de atenuar ou minimizar os efeitos causados pela desnutrição e compreender a relação entre os efeitos adversos da desnutrição proteica durante a gestação e lactação e os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de hipertensão arterial.

Estudos dessa natureza são importantes para o combate e prevenção das injúrias induzidas pela desnutrição proteica perinatal. Assim, os resultados alcançados nesse estudo pretendem subsidiar os profissionais da área da saúde no esclarecimento de como a desnutrição proteica materna pode interferir sobre a formação e controle do sistema cardiorrespiratório, bem como o papel modulador da atividade física voluntária materna sobre as alterações observadas. Diante do exposto pode-se sugerir métodos não-farmacológicos para a prevenção e atenuação ou reversão de quadros patológicos associados ao ambiente perinatal causada pela desnutrição proteica.

4 HIPÓTESE

As mudanças fisiológicas induzidas pela atividade física voluntária materna antes e durante a gestação atenuam os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a pressão arterial e parâmetros respiratórios, tais como: FR, VT e VE.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

Avaliar as modificações respiratórias e bioquímicas da prole de ratos que foram provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal.

5.2 Objetivos Específicos:

Em ratos desnutridos oriundos de mães ativas ou inativas:

- Analisar os parâmetros cardiovasculares, tais com pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PS), pressão arterial diastólica (PD) e frequência cardíaca (FC)
- Avaliar os parâmetros ventilatórios, tais como frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE).
- Analisar os parâmetros bioquímicos, tais como proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos e glicose.
- Estudar a associação entre nível de atividade física e os parâmetros estudados
- Investigar o papel modulador e reprogramador da atividade física voluntária materna sobre os parâmetros cardiorrespiratórios.

6 METOLOGIA

6.1 Animais

Foram utilizadas 12 ratas nulíparas da linhagem Wistar, 80 dias de vida com peso corporal compreendido entre 220 e 260 g e seus filhotes machos (n=48), provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFPE sob o protocolo (23076.021679/2015-87) e seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

6.2 Dietas e Indução da Desnutrição Proteica

Para a manipulação nutricional foram utilizados três tipos de dieta de acordo com a American Institute of Nutrition (AIN)-93 **tabela 1** (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993):

- Mãe: Recebeu dieta de manutenção durante todo o período de adaptação (30 dias) antes do acasalamento;
- Grupo NP: Recebeu dieta normoproteica (17% de proteína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias) e;
- Grupo HP: Recebeu dieta hipoproteica (8% de proteína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias).

Tabela 1- Composição nutricional da dieta (g/100g de dieta)

Nutriente	Grupo NP (17% proteína)	Grupo HP (8% proteína)	Manutenção
Caseína (85%)	20	9,41	14,10
Amido dextrinizado	13	13,2	15,50
Celulose	5	5	5

Sacarose	10	10	10
Amido de milho	39,74	50,34	46,47
Óleo de soja	7	7	4
Colina	0,25	0,25	0,25
Metionina	0,3	0,3	0,18
Mix vitamínico	1	1	1
Mix mineral	3,5	3,5	3,5
BHT#	0,001	0,001	0,008
Densidade energética (KJ/g)	16,26	16,26	16,26

Fonte: REEVES, 1993.

* A caseína utilizada para preparação das dietas tinha 85% de pureza.

Butihidroxitolueno.

Ratas nulíparas foram acasaladas com ratos na proporção de 1:2. A observação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1º dia de prenhez. A partir da determinação da prenhez, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais e alocadas aleatoriamente em suas respectivas dietas (n = 3/grupo).

A prole proveniente destas fêmeas foi reduzida a 8 ratos por ninhada, logo após o nascimento. Após o desmame (a partir do 22º dia de vida), todos os filhotes receberam a dieta para ratos de biotério (Presence, Purina Agribands, São Paulo, Brasil). Após o desmame as ratas e os machos utilizados para obtenção da prole foram eutanasiados com uma overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 40mg/Kg). Além disso, a prole de fêmeas também foram eutanasiadas com overdose de anestésico. Caso a ninhada tivesse menos de 8 ratos, fêmeas foram utilizadas para padronização do tamanho da ninhada. Os estudos funcionais na prole foram realizados ao 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida.

6.3 Protocolo de atividade física voluntária

A gaiola de atividade física voluntária (GAFV) é feita de acrílico, possui as seguintes dimensões: 27 cm de largura, 34 cm de altura e 61 cm de comprimento e, em uma das extremidades, foi posicionado um cicloergômetro com 27 cm, composto por acrílico e raios em aço inoxidável (**figura 1**), acoplado a um sistema de monitoramento por sensor (ciclocomputador Cataye, model CCVL810, Osaka, Japan). A atividade física das ratas foi avaliada pela movimentação do cicloergômetro, sendo quantificado diariamente através dos sensores que permite o registro das seguintes grandezas físicas: Distância percorrida (km), tempo de atividade (min) e estimativa do gasto calórico (Kcal).

As ratas nulíparas (n=12) aos 90 dias de vida foram colocadas individualmente nas GAFV (**figura 1**) por um período de 30 dias para a adaptação e receberam durante esse período dieta AIN-93 (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993). Após esse período, as ratas foram classificadas em três grupos de acordo com o nível de atividade física diário: Inativo (I, n =6) ou Ativo (A, n=6) de acordo com os parâmetros e valores apresentados na (**tabela 2**).

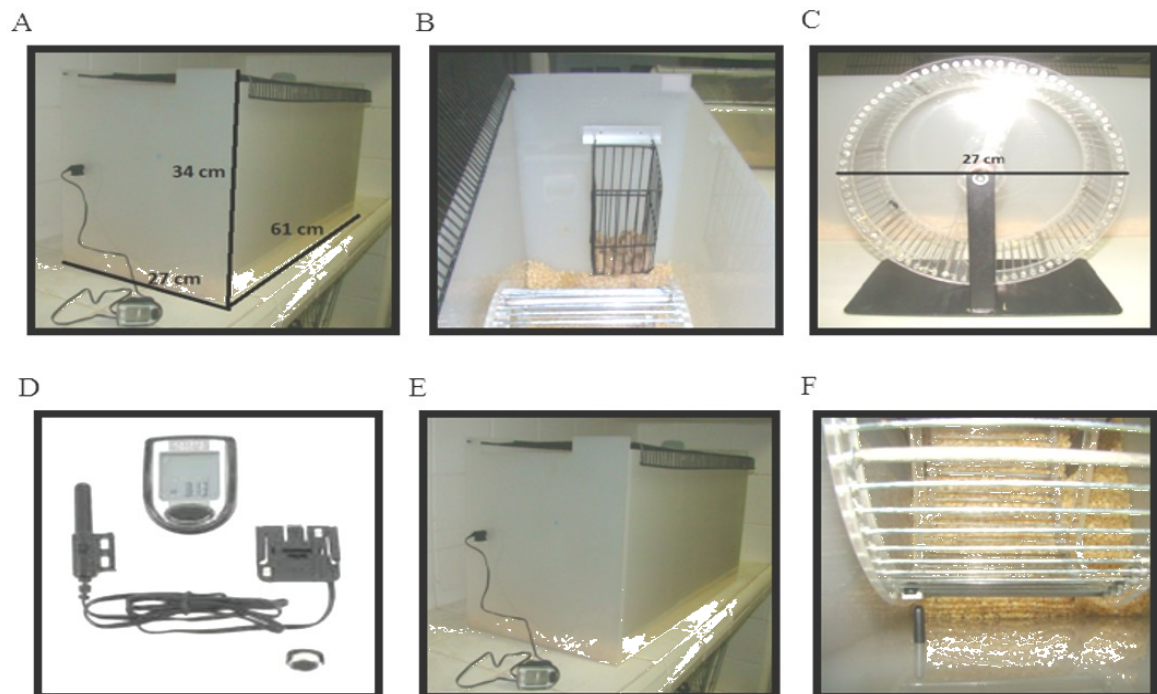
As ratas foram colocadas em gaiola padrão de biotério feita de polipropileno para o acasalamento e após a presença de espermatozoide na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002), foram recolocadas individualmente nas GAFV onde metade de cada grupo recebeu dieta NP e a outra metade recebeu a dieta HP durante toda gestação. Dessa forma, obtivemos tais grupos: NP inativo, NP ativo, HP inativo e HP ativo.

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	Distância percorrida (Km.dia-1)	Gasto Calórico (Kcal.dia-1)	Tempo de atividade (min.dia-1)
Inativo	< 1.0	< 10.0	< 20.0
Ativo	>1.0 <5.0	>10.0 <40.0	>20.0 <120.0

Fonte: (ADAPTADO À SANTANA MUNIZ et al., 2014).

Figura 1- Esquema do funcionamento do ciclocomputador: Ciclocomputador com os sensores [Cataye, model CC-VL810, Osaka, Japan] (A); Posicionamento de um sensor na porção externa da GAFV, acoplado ao ciclocomputador (B); visão interna dos sensores, um acoplador ao cicloergômetro e outro a GAFV (C); Rata realizando a atividade física (D).



6.4 Procedimento cirúrgico para implante do cateter arterial

Após completar 30 dias de vida, foi realizado o procedimento para implante dos cateteres de polietileno (PE10 conectado ao PE50) na artéria femoral, para registro da pressão arterial. O registro da PA foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico. O cateter foi exteriorizado subcutaneamente até a altura das escápulas para facilitar a conexão dele ao transdutor de pressão. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose de cetoprofeno (5 mg/kg ip, anti-inflamatório) para evitar reações inflamatórias (DE BRITO ALVES et al., 2014).

6.5 Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca

Após a cirurgia, os animais ficaram em recuperação por 24 horas até o início dos experimentos. O registro da pressão arterial e da frequência cardíaca foi realizado em animais não anestesiados por meio da conexão da cânula na artéria aorta abdominal com o transdutor mecanoelétrico de pressão, cujo sinal é devidamente amplificado (2000k/s, ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivadas da pressão arterial pulsátil (PAP) por meio deste sistema de aquisição.

6.6 Medidas ventilatórias

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado. 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 ventilação do animal 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) (**figura 2**). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar (1mL) 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) (MALAN, 1973).

6.7 Análise Bioquímica do soro

Foram realizadas análises bioquímicas com o propósito de investigar se a desnutrição proteica, durante períodos críticos do desenvolvimento (gestação e lactação), afeta o metabolismo proteico da prole. Para isso, os animais passaram

por jejum de 12 horas (19h00min – 07h00min), mantidos em suas respectivas gaiolas, contendo água ad libitum e, logo após este período de privação alimentar, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, ip.) e ketamina (80 mg/kg, ip.) para a realização da coleta de sangue, a qual, com auxílio de um capilar de vidro não-heparinizado, foi realizada o rompimento do plexo retro-orbital das mães após 30 dias de atividade física, e dos filhotes quando estes completaram 21 e 30 dias de vida. Após a coleta do sangue, as amostras foram colocadas em tubos sem anticoagulantes e, em seguida, foi realizada a centrifugação a 3500 RPM por 10 minutos para obtenção do soro. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, transferido para um tubo Eppendorf e armazenado a -20°C, o qual, posteriormente, foi encaminhado para realização das análises bioquímicas de Albumina, Proteínas totais, Triglicerídeo, Colesterol total e Glicose utilizando-se seus respectivos kits comerciais e seguindo recomendações e procedimentos determinados pela empresa fabricante (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil)

6.8 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm epm (erro padrão da média). Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 5® (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 ANOVA two-way e o pós-teste Bonferroni, tendo como fatores a dieta e a atividade física. Foi considerado o nível de significância quando $p < 0,05$

7 RESULTADOS

7.1 Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros bioquímicos

Com o objetivo de analisar o estado nutricional dos animais e observar se a atividade física voluntária da mãe é capaz de minimizar as alterações bioquímicas causadas pela desnutrição proteica durante a gestação e lactação, alguns parâmetros bioquímicos das proles foram avaliados aos 22 e 30 dias de vida, como proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol total e glicose. Aos 22 dias de vida, foi possível analisar o perfil bioquímico dos animais logo após o desmame e, aos 30 dias de vida, as mesmas análises foram reavaliadas após os animais receberem dieta comercial para animais de laboratório.

Observou-se entre os grupos normoprotéicos que o nível de atividade física materna não interfere nos parâmetros bioquímicos dos animais nas duas idades analisadas, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4. Além disso, foi possível observar aos 22 dias que o grupo HP inativo mostraram uma redução nos níveis de proteínas, albumina, triglicerídeos e colesterol e um aumento nos níveis de glicose quando comparados com o grupo NP. Aos 30 dias de vida os animais HP permaneceram com uma diminuição nos níveis séricos de proteínas e albumina e começaram a apresentar um aumento de triglicerídeos quando comparados com o grupo NP. O nível de atividade física materna interferiu nos parâmetros bioquímicos da prole desnutrida, uma vez que os animais HP-ativos apresentaram níveis bioquímicos semelhantes aos dos animais normoprotéicos.

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos séricos (proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol total e glicose) da prole de ratos, aos 22 dias de idade, de mães submetidas a dieta normoprotéica (NP, 17% de proteína, n=8) ou Hipoprotéica (HP, 8% de proteína n=8).

22ºDIA						
	NP	HP	NP- inativo	NP- Ativo	HP- inativo	HP - Ativo
PROTEÍNA TOTAL	6.08±0.15	5.29±0.10*	6.06±0.10	5.20±0.70	4.88±0.01*	5.37±0.15 [#]
ALBUMINA	2.59±0.11	2.10±0.06*	3.08±0.10	3.17±0.18	2.08±0.13*	2.60±0.33 [#]
TRIGLICERÍDEOS	130.0±8.01	77.00±6.01*	132.00±7.01	131.00±4.01	85.00±5.01*	131.0±4.01 [#]
COLESTEROL	122.00±11	89.00±6.01*	102.00±4.01	110.00±3.01	54.00±4.01*	117.00±12.01 [#]
GLICOSE	107.90±3.7	134.00±5.30*	123.60±7.01	120.00±1.01	187.0±5.01*	110.00±5.01 [#]

* 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 (one-way ANOVA).

Tabela 4- Parâmetros bioquímicos séricos (proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol total e glicose) da prole de ratos, aos 30 dias de idade, de mães submetidas a uma dieta normoproteica (NP, 17% de proteína, n = 8) ou hipoproteica (LP, 8% de proteína, n = 8) durante a gestação e lactação.

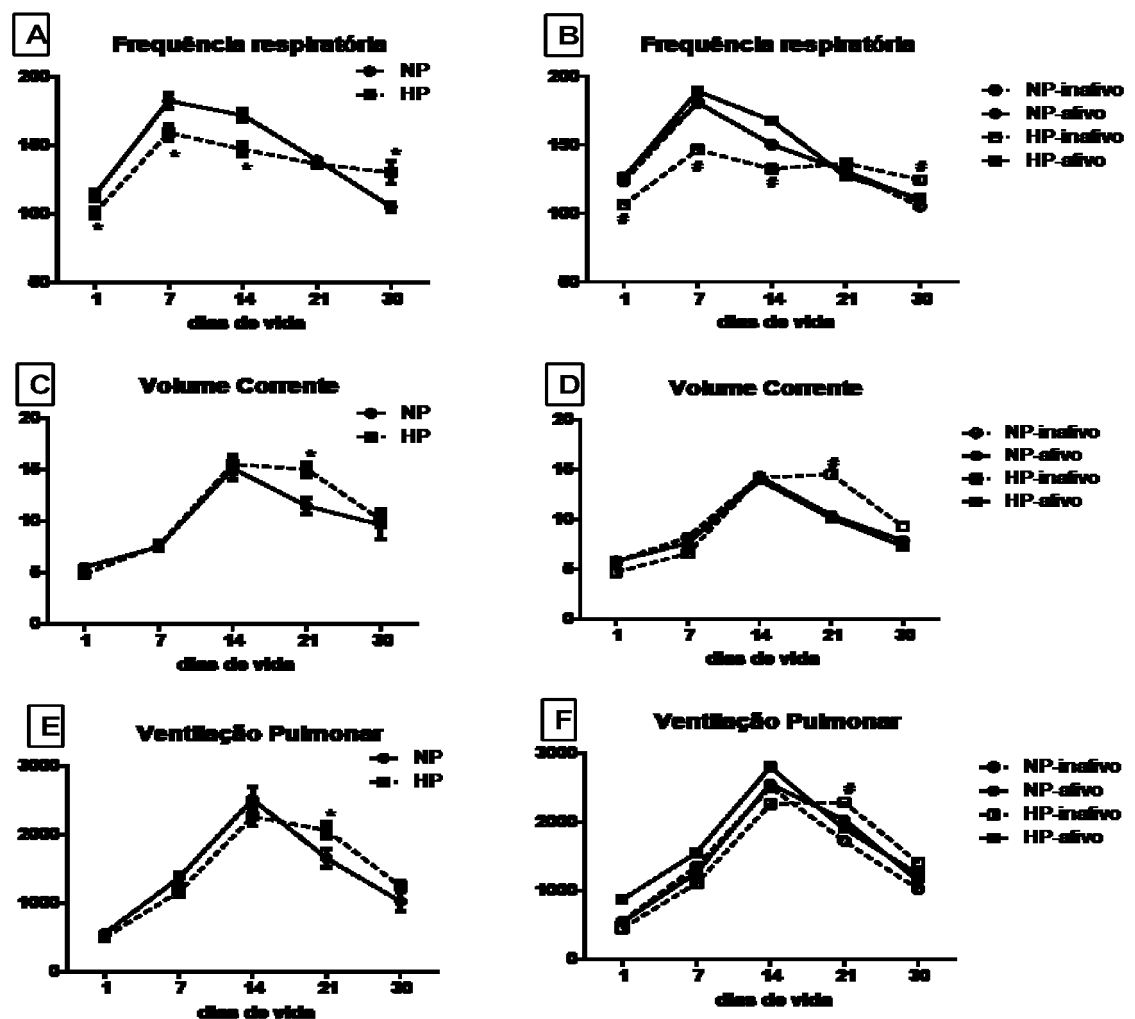
30ºDIA						
	NP	HP	NP- inativo	NP- Ativo	HP- inativo	HP - Ativo
PROTEÍNA	6.32±0.	5.60±0.4	6.43±0.29	6.68±0.40	4.80±40*	6.54±0.08 [#]
TOTAL	20	0*				
ALBUMINA	3.14±0.	2.60±0.1	3.30±0.10	3.40±0.10	2.80±0.1	3.10±0.10 [#]
	10	0*			0*	
TRIGLICERÍ	164.0±8	260.01±2	163.02±14	177.20±7.	261.01±6	188.00±6.0
DEOS	.14.0	0.00*	.0	01	.00*	0 [#]
COLESTER	114.00±	99.01±4.	105.00±5.	130.00±13	102.01±4	132.00±5.0
OL	0.1	00	01	.01	.00*	0 [#]
GLICOSE	92.00±5	99.01±2.	84.00±13.	88.00±8.0	89.01±4.	91.00±5.00
	.01	00*	01	1	00	

* 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 (one-way ANOVA).

7.2 Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros ventilatórios

A desnutrição proteica leva a alterações ventilatórias (Figura 3) a partir dos primeiros dias de vida, quando o sistema respiratório não está totalmente desenvolvido. Em animais normoproteicos, o nível de atividade física materna não interfere nos parâmetros respiratórios dos animais. Enquanto a prole de ratos desnutridos (grupo HP) apresentaram uma diminuição na FR no 1º, 7º, 14º dia de vida (Figura 3A). Interessantemente, aos 30 dias de vida, eles apresentam níveis elevados de FR. Após a atividade física voluntária da mãe, os filhos de uma mãe com um fenótipo inativo permanecem com essas alterações respiratórias (Figura 3B). No entanto, os filhos das mães ativas, mesmo após a desnutrição, apresentam níveis semelhantes aos dos animais NP. Com relação à VT (Figura 3 C e D) e VE (Figura 3 E e F), observou-se aumento nos animais HP e HP inativo aos 21 dias, um aumento que não ocorreu na prole HP-ativo.

Figura 2- Parâmetros ventilatórios (frequência respiratória - FR, volume corrente - VC e ventilação pulmonar - VE) da prole de ratos, ao 1, 7, 14, 21 e 30 dias de vida, de mães submetidas à dieta normoproteica (NP, 17% proteína, n = 8) ou hipoprotéica (HP, 8% de proteína, n = 8) durante a gestação e lactação. E de mães que realizaram atividade física voluntária (NP-ativo, n = 8, HP-ativo, n = 8). A, C e E mostram os parâmetros ventilatórios de ratos que não praticaram atividade física (grupos NP e HP), B, D e F mostram os parâmetros entre os grupos inativos e ativos. (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 análise intragrupo (two-way ANOVA).



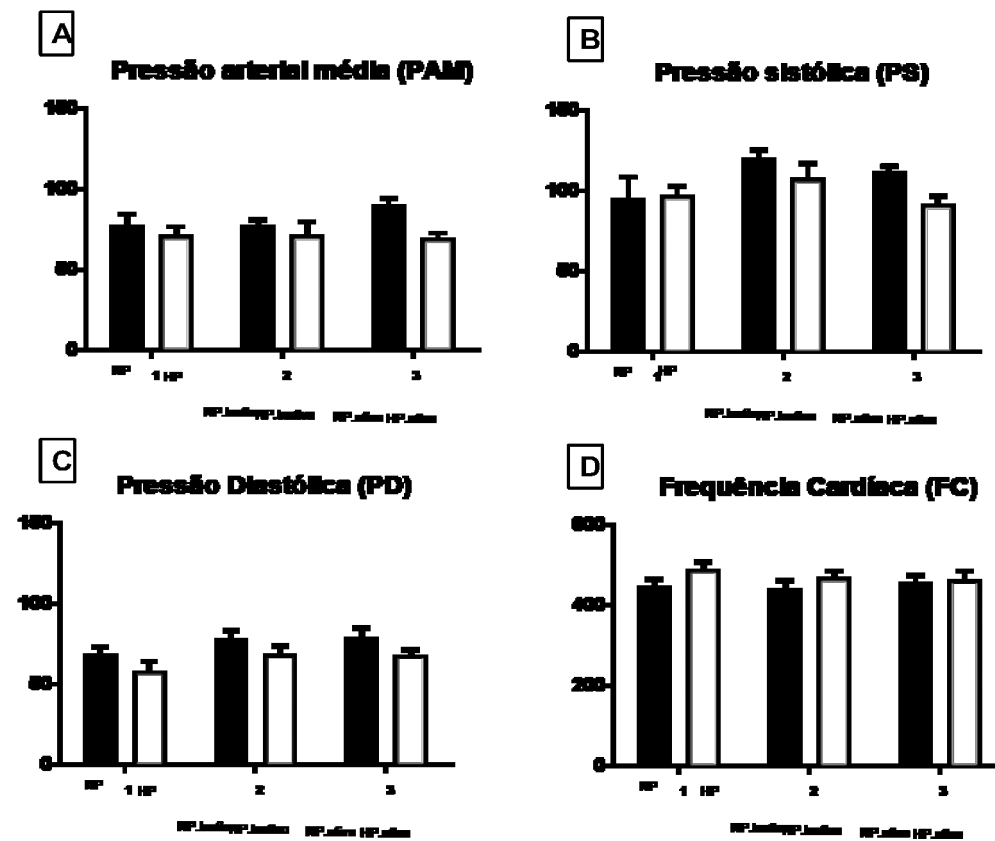
Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

7.3 Efeitos da desnutrição proteica e atividade física voluntária sobre os parâmetros cardiovasculares

A partir da análise da função cardíaca obtiveram-se os valores da Pressão Arterial Média (PAM) (**Figura 3 A**), Pressão sistólica (PS) (**Figura 3 B**), Pressão diastólica

(PD) (**Figura 3 C**) e Frequência Cardíaca (FC) (**Figura 3 D**) aos 30 dias de idade. Após a análise dos níveis pressóricos dos animais, foi possível observar que o grupo hipoproteico apresentou valores semelhantes comparado com o grupo controle. Além disso, o nível de atividade física materna não interferiu nesses valores nos grupos tanto hipoproteicos quanto normoprotéicos. Demonstrando que essas variáveis, desnutrição proteica e atividade física, não são capazes de gerar alterações desses parâmetros dos animais na idade do estudo.

Figura 3- Parâmetros cardíacos (A, pressão arterial média - PAM, B, pressão sistólica - PS, C, pressão diastólica - DP e D, frequência cardíaca - FC) da prole de ratos, com 30 dias de vida, de mães submetidas a dieta de normoproteica (NP, 17% de proteína, n = 8) ou hipoproteica (HP, 8% de proteína, n = 8) durante a gestação e lactação. E de mães que praticaram atividade física voluntária (NP-ativo, n = 8, HP-ativo, n = 8). Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. Os valores médios foram analisados após análise intragrupo (two-way ANOVA).



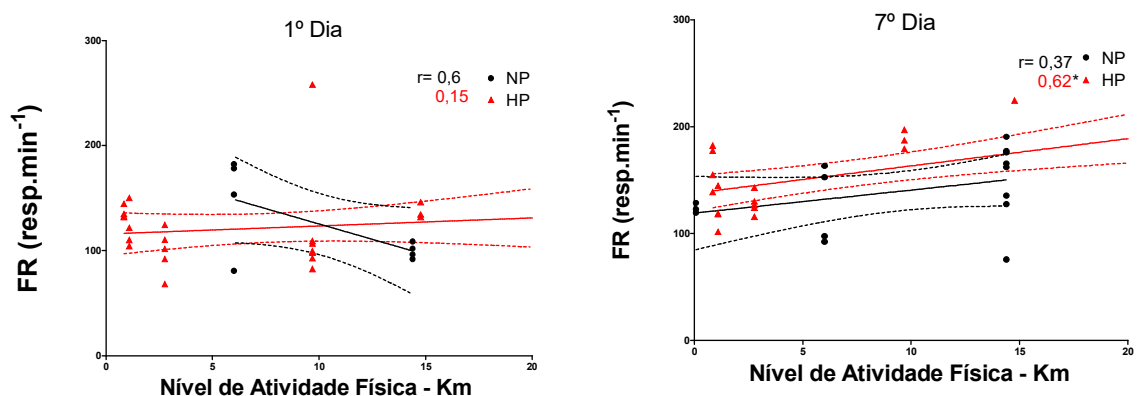
Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

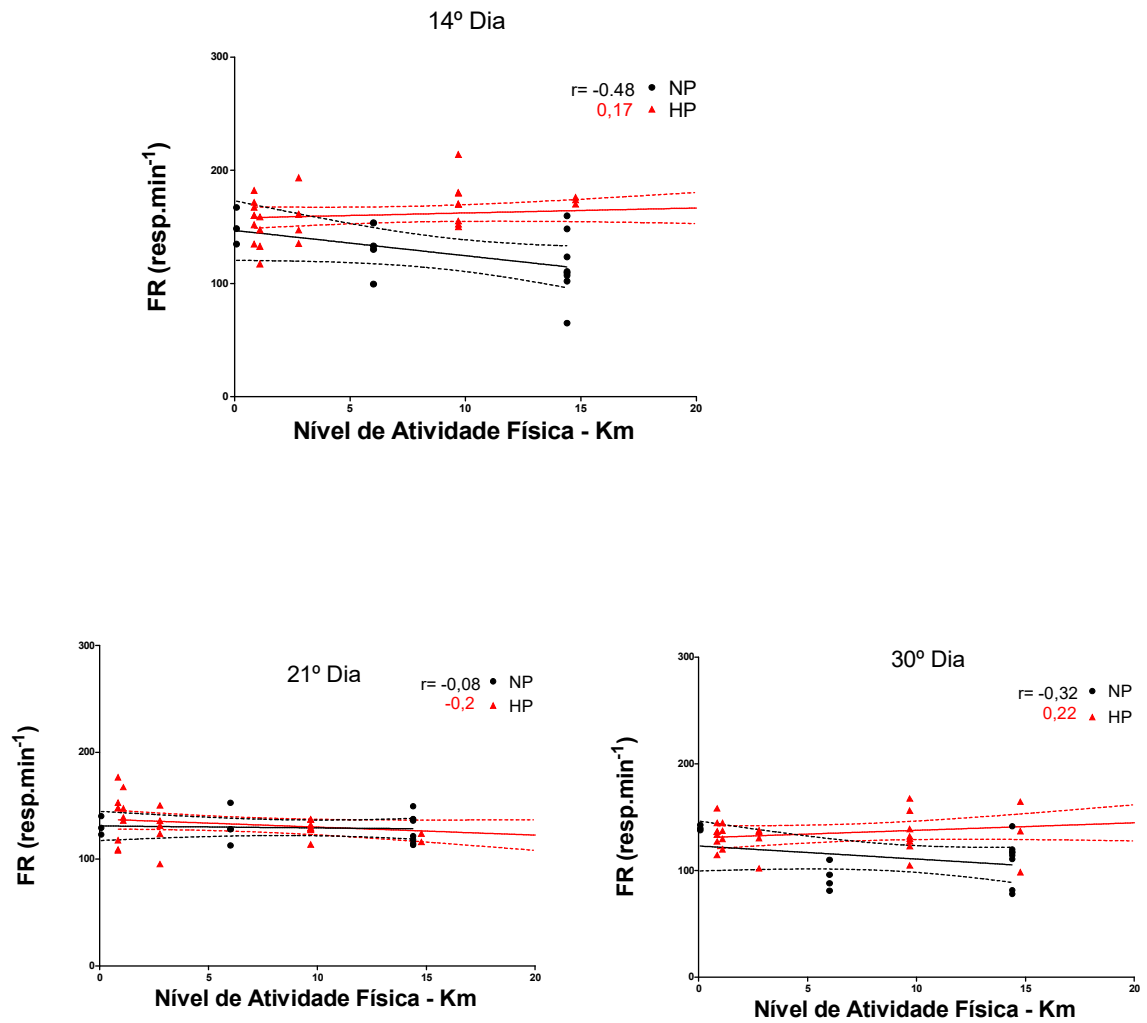
Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

7.4 Correlação entre atividade física voluntária materna e parâmetros respiratórios

A partir das análises dos parâmetros ventilatórios dos ratos submetidos a desnutrição proteica perinatal, passamos a examinar a variação do nível de atividade física materna e como isso pode se correlacionar com a frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE) no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida da prole dessas mães. Ao realizar a correlação de Pearson (r) foi possível observar correlação significativa positiva entre o nível de atividade física materna e frequência respiratória da prole no 7º dia de vida que sofreu desnutrição proteica durante a gestação e lactação (Fig. 4). Demonstrando que maior nível de atividade física materna mostrou correlação com maiores valores desses parâmetros nestas idades (MUKAKA, 2012). Em relação ao VT e VE, ao correlacionar esses valores com o nível de atividade física materna, não foram encontradas correlações estatisticamente significantes entre os valores de VT e VE nos animais estudados (Fig. 5 e 6).

Figura 4- Correlação entre nível de atividade física voluntária materna e frequência respiratória da prole no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º dia de vida. Correlação de Pearson (r).

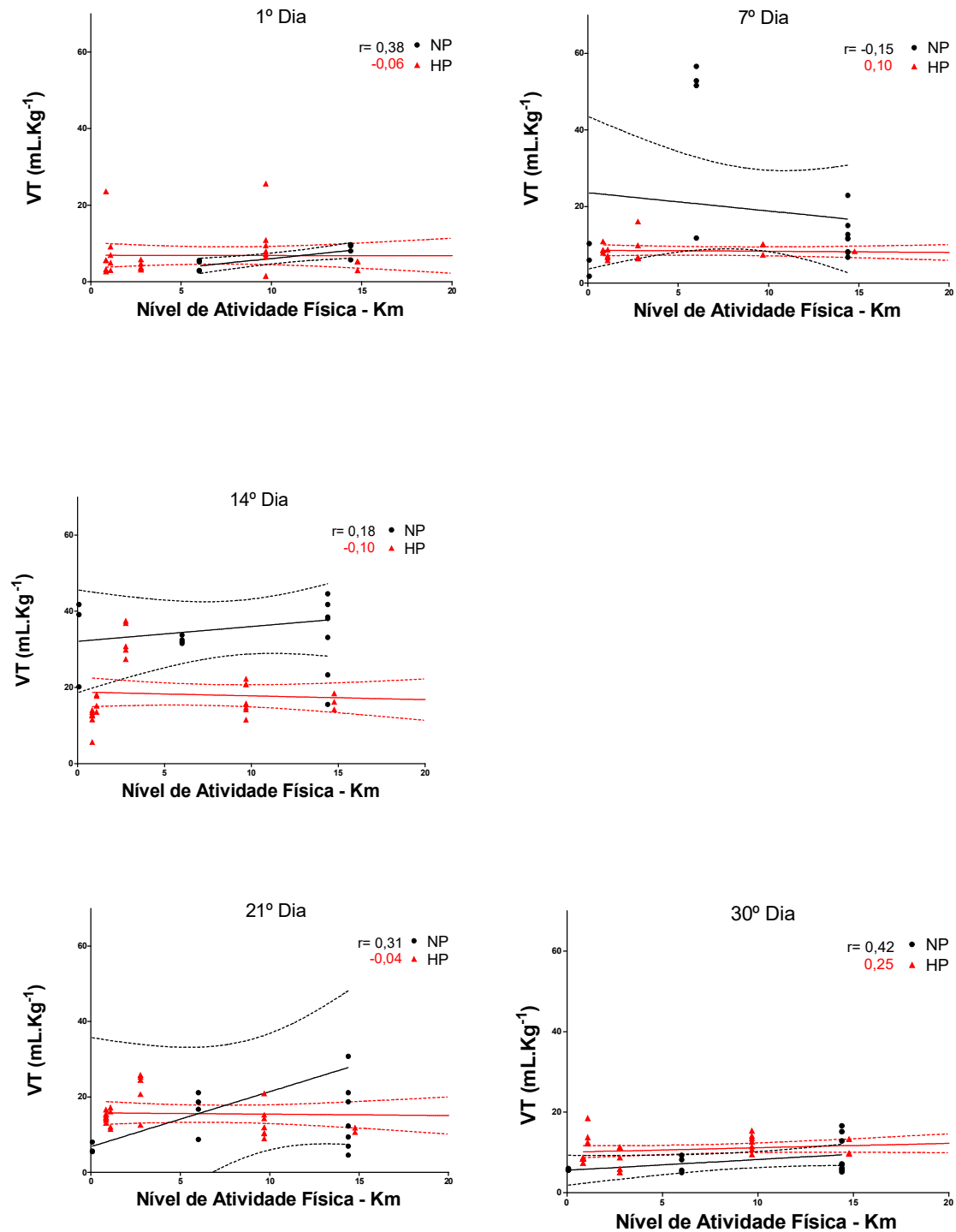




Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

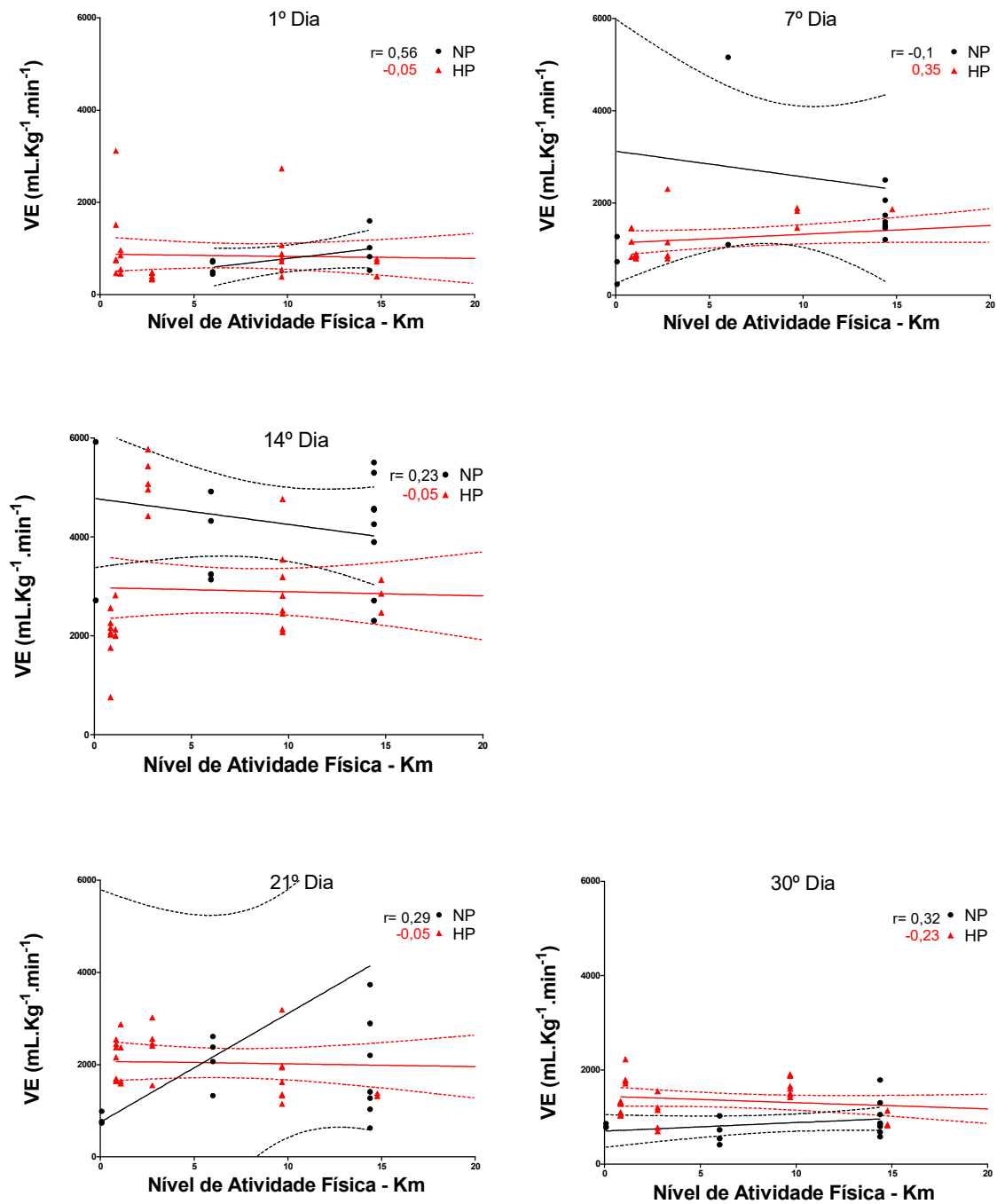
Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Figura 5- Correlação entre nível de atividade física voluntária materna e volume corrente (VT) da prole no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º dia de vida. Correlação de Pearson (r).



Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

Figura 6- Correlação entre nível de atividade física voluntária materna e ventilação pulmonar (VE) da prole no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º dia de vida. Correlação de Pearson (r).

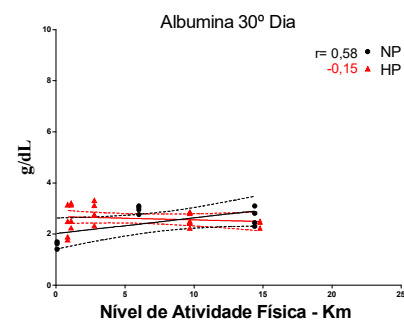
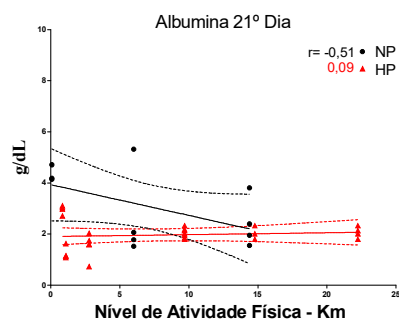
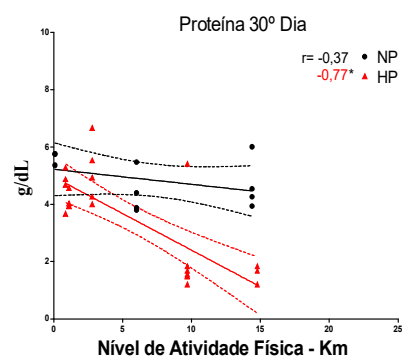
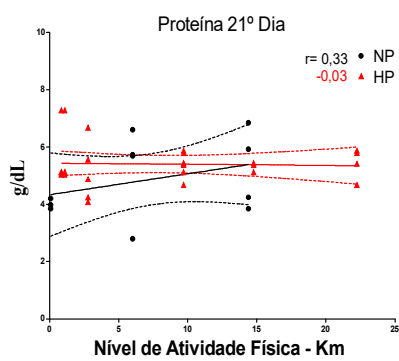


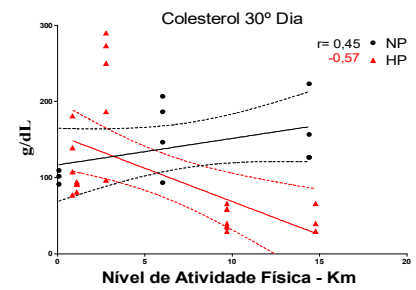
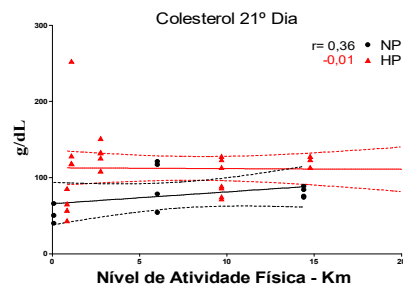
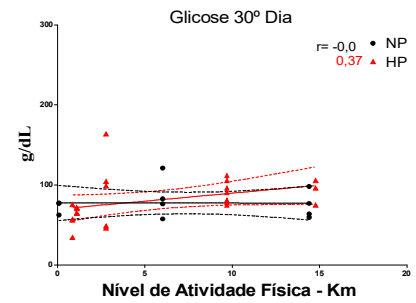
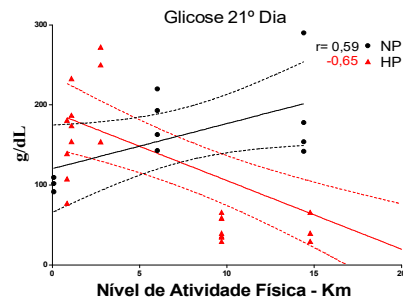
Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

7.5 Correlação entre atividade física voluntária materna e parâmetros bioquímicos

A partir das análises dos parâmetros bioquímicos dos ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal, passamos a examinar a variação do nível de atividade física materna e como isso pode se correlacionar com os valores de proteínas totais, albumina, glicose e colesterol no 21º e 30º dia de vida da prole dessas mães. Ao realizar a correlação de Pearson (r) uma correlação negativa significativa foi observada entre o nível de atividade física e os valores de proteínas totais e colesterol nos animais hipoproteicos no 30º dia de vida da prole. Além disso, o nível de atividade física mostrou correlação negativa significativa com os níveis de glicose da prole desnutrida ao 21º dia de vida. Não foram encontradas correlações estatisticamente significantes entre os valores de albumina analisados nos animais estudados (**Fig.7**).

Figura 7- Correlação entre nível de atividade física voluntária materna e parâmetros bioquímicos da prole no 21º e 30º dia de vida. Correlação de Pearson (r).





Fonte: ANDRADE, L.D.S. de, 2019.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós investigamos se a atividade física voluntária materna é capaz de reverter às alterações respiratórias causadas pela desnutrição proteica, bem como, também, investigamos o papel da atividade física voluntária materna e da dieta hipoproteica durante o período perinatal sobre as alterações cardiovasculares e os parâmetros bioquímicos.

Os filhotes de ratos derivados de mães submetidas à desnutrição proteica durante a gestação e lactação demonstraram níveis séricos reduzidos de proteína e albumina, confirmando o estado de desnutrição da prole. Além disso, a mesma prole desnutrida também apresentou uma redução na FR desde os primeiros dias de vida, quando o sistema respiratório não está completamente maduro.

No período de lactação, ocorrem os eventos tardios da neurogênese e gliogênese seguindo de migração e diferenciação celular, formação de mielina e sinaptogênese, em ratos (MORGANE et al., 1993). Segundo Morgane (1993), é neste período que ocorre uma maior integração e maturação da comunicação entre o SNC e a periferia. Interessantemente, após uma maturação do sistema respiratório (30 dias de idade), os animais HP começam a mostrar um aumento na FR. No entanto as mudanças bioquímicas e ventilatórias parecem ser evitadas nos filhos de mães com um fenótipo ativo.

Alguns estudos experimentais e epidemiológicos tem demonstrado a relação dos eventos adversos, a exemplo da restrição proteica, durante o período perinatal (gestação, lactação e primeira infância) o que consiste em um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta destas proles, pois, é justamente nestes períodos iniciais da vida (como gestação e lactação), que órgãos e tecidos apresentam fases de rápida diferenciação celular, hiperplasia e hipertrofia e, por isso, são denominados de períodos críticos para o desenvolvimento (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002).

Porém, se observarmos os valores do grupo ativo e que receberam a mesma dieta (dieta com baixo valor de proteína), percebemos que os seus níveis mantiveram-se equivalentes quando comparados ao seu grupo controle, o que corrobora com os estudos de Gluckman (2005), quando afirma que estímulos ambientais (como o fumo, álcool, estresse, nutrição e atividade física) podem atuar

nos processos de plasticidade alterando o desenvolvimento do organismo. Isso nos mostra, mais uma vez, o efeito benéfico e remodelador da atividade física, sendo capaz de atenuar os efeitos da dieta hipoproteica,

A menor ingestão protéica durante períodos críticos de desenvolvimento fetal, a exemplo de gestação e lactação, é capaz de promover redução dos níveis séricos de proteínas totais e albumina, dados estes que corroboram com estudos prévios do nosso laboratório de Brito-Alves, et. al., (2014). Foi proposto que, após o nascimento, a restrição protéica materna durante a lactação afeta os níveis de proteínas contidas no leite materno (GRIGOR, ALLAN et al., 1986). O que reduz a ingestão protéica da prole, levando à redução dos níveis séricos de proteína total e albumina, como observado aos 22 e 30 dias de idade dos animais hipoprotéicos.

A redução dos valores séricos de proteína pode ser explicada por dois fatores. Primeiro, em relação ao baixo suprimento de proteína na dieta materna, o que pode induzir um déficit no transporte de aminoácidos materno-fetais pela placenta, levando à restrição do crescimento fetal, principalmente em tecidos musculares e adiposos, produzindo um baixo peso ao nascer. Outro fator que pode estar relacionado com a restrição protéica, seria durante o período de lactação, o que, segundo Pires e colaboradores (2009), levaria a redução dos níveis de lactalbumina nas mães, reduzindo as proteínas ingestão e, portanto, síntese proteica pelos filhotes.

No entanto, a atividade física voluntária da mãe protegeu seus filhos, impedindo-os de ter uma redução nos níveis séricos de proteína e albumina. Tem sido proposto que durante a prática de atividade física há uma redução nos níveis de oxigênio e nutrientes para a placenta e consequentemente para o feto, enquanto momentos após o exercício há um aumento no fluxo sanguíneo placentário, sendo capaz de transportar mais oxigênio e nutrientes para o feto, por um mecanismo que induz um aumento no volume da placenta, aumentando as vilosidades terminais, estruturas semelhantes a dedos formados na placenta, cuja função é de se encher de sangue materno e passar nutrientes e oxigênio para o feto (CLAPP, KIM et al. 2002; THOMAS et al. 2008; PERKINS, PIVARNIK et al. 2007; SANTANA MUNIZ, BEZERRA et al. 2014).

Possivelmente, esses efeitos pós-exercício podem minimizar as alterações bioquímicas causadas pelo nosso modelo de desnutrição, porque, nas horas após o exercício, o aumento do fluxo sanguíneo para a placenta pode transportar mais nutrientes e oxigênio, fornecendo uma quantidade maior desses nutrientes. Além disso, o nível de atividade física realizado pela mãe tem um significado importante sobre essa proteção para o feto, o que, segundo Muniz (2011), sua prática regular vem demonstrando um bom perfil para saúde, bem como de ser considerado um possível reprogramador dos efeitos deletérios causados pela desnutrição precoce.

Santana Muniz e Colaboradores (2014), padronizando um modelo de atividade física voluntária com um cicloergômetro no interior da gaiola, classificou os animais de acordo com a distância percorrida, tempo de atividade e gasto calórico em inativos, ativos e muito ativos. A fim de avaliar se a atividade física foi capaz de atenuar os efeitos causados pela desnutrição proteica, foram utilizados os filhotes de mães que tinham um fenótipo inativo ou muito ativo. Curiosamente, os descendentes de ratos desnutridos que tinham um fenótipo muito ativo, apesar de apresentarem desnutrição, não apresentaram níveis reduzidos em proteínas totais e albumina. Sugere-se que o aumento do fluxo sanguíneo para uma placenta e conseqüentemente para o feto forneceu mais nutrientes o que, conseqüentemente, reduziu os efeitos causados pela desnutrição.

Estudos publicados por Leandro e Colaboradores (2009), têm demonstrado que a atividade física materna e o aporte energético induzem adaptações fisiológicas na gestação e atuam como reguladores crônicos e agudos da disponibilidade de oxigênio e de substrato para o binômio mãe-filho. Essa mesma proteção do fenótipo materno pode ser entendida pelos níveis de triglicérides, colesterol total e glicose.

A redução na ingestão de proteínas também pode levar à redução dos níveis plasmáticos de triglicérides no grupo HP aos 22 dias de idade, diminuindo a síntese hepática de VLDL (MADANI, PROST et al. 2000). O que tem sido destacado como um importante portador de triglicerídeos endógenos, além do aumento da oxidação lipídica para fins energéticos em animais desnutridos (GRILL E HAYES 2009).

No entanto, a reabilitação nutricional de animais submetidos à desnutrição protéica acarreta, a longo prazo, aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos,

associado ao diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (HOLNESS, FRYER et al. 1998). O aumento inicial de triglicérides encontrado em nossos animais desnutridos aos 30 dias de vida apenas enfatiza o risco do desenvolvimento de doenças metabólicas devido à desnutrição perinatal.

Em relação ao aumento da glicemia de jejum nos animais HP e HP inativos aos 22 anos de idade, Park et al. (2003) observaram que a desnutrição, mesmo a curto prazo, é capaz de causar alterações mitocondriais no fígado e no músculo esquelético, sendo estes os principais órgãos afetados pela insulina, o que poderia justificar o aumento da glicemia de jejum encontrada no grupo desnutrido (PARK, KIM et al., 2003).

Estudos publicados por Muniz e Colaboradores (2014) sugerem que a atividade física voluntária materna em cicloergômetros é capaz de alterar parâmetros relacionados ao crescimento somático e a captação de glicose em resposta à insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo, levando a um menor risco para o aparecimento de doenças crônicas na vida adulta, a exemplo da HAS e diabetes mellitus tipo 2.

Além disso, as alterações metabólicas secundárias à desnutrição que ocorrem no pâncreas podem retardar o desenvolvimento de células β e, conseqüentemente, diminuir a secreção de insulina em resposta à glicose (TEZINI, DIAS et al. 2013; MALAFAIA 2014). Estudos tem demonstrado que um aumento nas concentrações de glicose induz aumento na secreção de insulina, a qual, segundo Randle e colaboradores (1963), isso irá suprimir a liberação de ácidos-graxos não esterificados do tecido adiposo. Já no sistema nervoso, o exercício físico regula alterações epigenéticas de genes como o fator de crescimento similar a insulina-1 (IGF-1), VEGF, BDNF e outras neurotrofinas através de acetilações na histona H3 das regiões promotoras dos genes, aumentando a sua transcrição (NTANASIS et al., 2013).

Em relação aos dados de ventilação, sabemos que a mesma é regulada a todo o momento de acordo com as necessidades respiratórias do organismo (MOURADIAN; FORSTER; HODGES, 2012). Estudos do nosso laboratório relatam que a desnutrição proteica perinatal é capaz de promover a curto prazo (30 dias de vida) aumento de frequência respiratória, associado com alterações a longo prazo,

aos 90 dias de vida os animais desnutridos apresentam aumento da pressão arterial ([DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2014](#)). Sugerindo que há uma relação entre distúrbios ocasionados no sistema respiratório na fase de vida inicial e a predisposição em desenvolver hipertensão arterial na vida adulta (ABDALA et al., 2012; DE BRITO ALVES et al., 2015).

Tem sido proposto que essas alterações ventilatórias são capazes de promover aumento de atividade nervosa simpática e, conseqüentemente, contribuir para o estabelecimento de hipertensão arterial na vida adulta ([DE BRITO ALVES, NOGUEIRA et al., 2015](#)). Estudos publicados por Brito-Alves e Colaboradores (2015) sugerem que atividade simpático-respiratória associada a uma maior sensibilidade de quimiorreceptores periféricos são mecanismos importantes na compreensão da origem da hipertensão arterial em indivíduos submetidos à desnutrição durante períodos críticos da vida. Entretanto, pouco se sabe sobre a partir de qual momento da vida se iniciam essas alterações fisiológicas e como a atividade física voluntária materna pode atenuar esses efeitos ocasionados pela desnutrição.

No estudo, também investigamos os efeitos a curto prazo da desnutrição e da atividade física voluntária materna e observamos que indivíduos provenientes de mães submetidas a desnutrição e com hábito de vida Ativo não apresentam alterações na FR, diferente dos indivíduos desnutridos sedentários e ativos, o que pode ser justificado que a dieta protéica durante a gravidez e lactação pode induzir mudanças permanentes nos mecanismos responsáveis pela modulação respiratória e geração de descendentes, afetando o controle da frequência respiratória desses animais. Esta fase de vida inicial corresponde ao período crítico para o desenvolvimento do sistema respiratório, no qual há intenso desenvolvimento e maturação de quimiorreceptores respiratórios e da rede neural respiratória (DARNALL, 2013; DE CARO et al., 2013).

Na região rostral ventral lateral do bulbo (RVLM) estão localizados neurônios geradores da atividade simpática (MORAES et al., 2013), nos quais possuem uma forte conexão com os neurônios respiratórios. Quando há um aumento da hiperatividade simpática, os níveis plasmáticos das catecolaminas são alterados, o que, conseqüentemente, levará a um estado de constrição dos vasos sanguíneos

periféricos, aumentando a resistência vascular periférica, o que acarretará na elevação dos níveis basais da pressão arterial (ZOCCAL *et al.*, 2009).

Qualquer perturbação ambiental neste período, a exemplo da desnutrição, pode comprometer a formação e maturação dessa rede neural respiratória e gerar alterações no desenvolvimento desse sistema. Além disso, é possível observar que após o 14º dia de vida há uma diminuição dos parâmetros ventilatórios dos animais normoproteicos. Nesta fase de vida há um aumento intenso das sinapses inibitórias gabaérgicas e glicinérgicas, sugerindo que esse aumento acontece para diminuir as predominantes sinapses glutamatérgicas, fortemente presentes durante o 1º e 7º dia de vida. Entretanto, diferentemente do grupo normoproteico, o grupo hipoproteico no 21º dia de vida apresenta um aumento do VT e do VE. Esses dados sugerem que a desnutrição é capaz de alterar a rede neuronal destes animais, possivelmente na cascata de alguns neurotransmissores e contribuir para o desenvolvimento de alterações ventilatórias observados ao longo da vida desses animais.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, foi observado que não houve diferença entre os grupos, sugerindo que a desnutrição proteica perinatal (gestação e lactação) não seja capaz de desenvolver alterações na função cardíaca durante o período de aleitamento. Estudos têm demonstrado que a desnutrição proteica não altera a função cardiovascular basal na fase de vida inicial da prole (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). Nossos dados corroboram com essa informação e ao que parece a atividade física voluntária, na idade do estudo selecionada, não altera os parâmetros hemodinâmicos. Entretanto, é necessário avaliar os efeitos a longo prazo desta atividade física, afim de tentar entender se realmente ela atenua os efeitos causados pela desnutrição sobre o sistema cardiovascular.

Informações interessantes vêm da análise da correlação entre o nível de atividade física e os parâmetros estudados. Encontramos correlação positiva entre o nível de atividade física e frequência respiratória ao 7º dia de vida da prole de mães desnutridas. Mostrando que à medida que a atividade física voluntária aumenta, os valores de FR desse grupo também aumentam. Além disso, encontramos uma correlação negativa entre o nível de atividade física e os valores de glicose no 21º dia de vida e colesterol no 30º dia de vida da prole hipoproteica. Mostrando que à medida que a atividade física diminui, os valores desses parâmetros aumentam.

Essas observações apoiam nossos resultados demonstrando que a atividade física voluntária materna é capaz de atenuar os efeitos causados pela desnutrição proteica sobre a FR nessa fase de vida inicial da prole. Além de atenuar os efeitos causados sobre os níveis de colesterol e glicose no 30º dia de vida. Evidenciando, a importância do estilo de vida materno no estado de saúde/doença da prole.

9 CONCLUSÃO

Nosso estudo tem demonstrado que o modelo utilizado de atividade física voluntária foi capaz de atenuar os efeitos causados pela desnutrição proteica em proles que sofreram insultos durante fases críticas do desenvolvimento. A prática de atividade física foi capaz de alterar alguns parâmetros bioquímicos e respiratórios dessas proles advindas de mães que consumiram uma dieta hipoprotéica. Dessa forma, os resultados encontrados demonstram sua importância acerca do papel da atividade física como um papel modulador da reprogramação do organismo frente ao ambiente e suas repercussões sobre os parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS

ABDALA, A.P., et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **J Physiol.** v. 590, n. 10, p. 4269-4277, fev 2012.

ALVES, J.L.B. et al. Baroreflex-evoked responses in rats submitted to protein undernutrition during perinatal period. In: **XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia e III Encontro Científico do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, Gramado-RS. Anais de Resumos (meio digital), 2012.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE. Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period. **Clin Obstet Gynecol.** v. 46, n.5, p. 496–499. 2009.

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

BARKER, D.J. The fetal and infant origins of adult disease. **British Medical Journal.** v. 301, n. 61, p. 1111, 1990.

BARKER, D.J. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 2, p. 115–128, 1998.

BARKER, D.J. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v.69, n.2 p. 577-80.1989.

BARKER D.J, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet.** 1:1077-1081. 1986.

BARROS, M. A. et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.4, n.2, Aug 2014.

BATESON, P., D. BARKER, et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**. v. 430, n.69, p. 419-421, 2004.

BATISTA FILHO, M. et al. Inquérito nutricional em área urbana da Zona da Mata Sul do Nordeste Brasileiro – Água Preta – PE. *O Hospital* 79: 139-155, 1971.

BENNELL, K. The female athlete. **Clinical sports medicine**, v.56 n.2, p. 674-99, 2001.

BISHWAJITA, G. Nutrition transition in South Asia: the emergence of non-communicable chronic diseases. **F1000**., v.2, n.1, Nov 2015.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult disease. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 41, n. 6, p. 158-76, Jul 2011.

[BURGGREN W.W](#), [MUELLER C.A](#). Developmental critical windows and sensitive periods as three-dimensional constructs in time and space. [Physiol Biochem Zool](#), v. 88, n.2, p.91-102, Mar-Apr 2015.

CLAPP, J. F. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 527-534, 2006.

CLAPP, J. F., 3RD. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and fetoplacental growth. **Eur J ObstetGynecolReprodBiol**, v.110, n.1, p. S80-5, Sep 2003.

CLAPP, J. F. et al. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 142-147, 2002.

CLAPP, J.F. et al. Níveis maternos de insulina-like growth factor-I (IGF-I) refletem massa placentária e massa gorda neonatal . **Am J Obstet Gynecol**, v.190, n.2, p.730 - 736 . Sep 2004.

COSTA MCMA. Quarenta anos de nutrição no Nordeste: uma retrospectiva. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco. 1995. 19-23

COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol**, v. 103, n. 4, p. 2095-106, Apr 2010.

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

CONTARTEZE, R.V.L. et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. 2008;151(3):415-22.

CZYZYK-KRZESKA, M. F.; TRZEBSKI, A. Respiratory-related discharge pattern of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. **J Physiol**, v. 426, p. 355-68, Jul 1990.

DARNALL, R. A. The carotid body and arousal in the fetus and neonate. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 185, n. 1, p. 132-43, Jan 2013.

DE BRITO ALVES, J. L. 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**, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction diet increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **The Journal of Nutrition**, v. 112, n. 5, p. 606-15, Feb 2015.

DE CARO, R. et al. Structural and neurochemical changes in the maturation of the carotid body. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 185, n. 1, p. 9-19, Jan 1 2013.

DIAS, C. M. et al. Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. **J Appl Physiol** , v. 97, n. 5, p. 1888-96, Nov 2004.

DIRETRIZ DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA E DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMODINÂMICA E CARDIOLOGIA INTERVENCIONISTA SOBRE INTERVENÇÃO CORONÁRIA PERCUTÂNEA. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. V. 109, n. 1, Supl. 1, Julho 2017.

FALCAO-TEBAS, F. et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **Br J Nutr**, v.107, n. 3, p. 372-7, Feb 2012.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 239-66, 2003.

FRAGOSO, J.; LIRA, A. O. et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. **Exp Physiol**. V. 102, n. 11, p. 1486-1499, Nov 2017.

FRANCO, M. C. et al. Effects of low birth weight in 8 to 13-year-old children: implications in endothelial function and uric acid levels. **Hypertension**. v. 48, n. 2, p. 45–50, 2006.

GAO, F. et al. Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. [Anim Reprod Sci.](#) v. 147, n. 3, p. 99-105, June 2014.

GARLAND, T. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **The Journal of experimental biology.** 2011;214(2):206-29.

GRIGOR, M. R.; ALLAN, J. et al. Milk composition of rats feeding restricted litters. **Biochem J.** v. 233, n.3, p. 917-919, 1986.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. **Int J Obes**, (Lond), v. 33, n. 1, p. 11-15, 2009.

GUYENET, P. G.; DARNALL, R. A.; RILEY, T. A. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am J Physiol*, v. 259, n. 5 Pt 2, p. R1063-74, ISSN 0002-9513 (Print), Nov, 1990.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking), May, 2006.

HAHN, M., S. DAMBACHER, et al. Heterochromatin dysregulation in human diseases. **J Appl Physiol**, v. 109, n.1, p. 232-242, 2010.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Developmental origins of health and disease: Moving from biological concepts to interventions and policy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v.115, n.3, 2011.

HASELTON, J. R.; GUYENET, P. G. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. **Am J Physiol**, v. 256, n. 3, p. R739-50, Mar 1989.

HOLNESS, M. J. et al. Moderate protein restriction during pregnancy modifies the regulation of triacylglycerol turnover and leads to dysregulation of insulin's antilipolytic action. **Mol Cell Endocrinol**, v. 142, n1-2, p. 25-33, 1998.

JOHNSON, J. R; FEIG, D. I.; NAKAGAWA, T. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. **J Hypertens**. v. 26, n. 3, p.381-391, 2008.

KUMON, M. K. et al. Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. **Neurochem Int**, v. 57, n.1, p. 43-50, 2010.

LANDSBERG, L. et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. **Obesity**, v. 21, p. 8–24, 2013

LANGLEY-EVANS, S. C.; DANIEL, Z. C. et al. Protein restriction in the pregnant mouse modifies fetal growth and pulmonary development: role of fetal exposure to {beta}-hydroxybutyrate. **Exp Physiol**, v. 96, n. 2, p. 203-215, 2011.

MUNIZ GS, BEZERRA R, DA SILVA GDP, FRAGOSO J, DE OLIVEIRA LIRA A, NASCIMENTO E, et al. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. **Physiology & behavior**. 129:1-10, 2014.

NTANASIS-STATHOPOULOS J, TZANNINIS J, PHILIPPOU A, KOUTSILIERIS M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. **J Musculoskelet & Neuronal Interactions**. 13(2):133-46, 2013.

LEANDRO, C. G, et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**. v. 13, n. 5, p. 343-8, 2007.

LEANDRO, C. G. et al. Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Rev. Nutr.** Campinas, v. 22, n. 4, p.559-569, jul./ago 2009.

LIU, Y. et al. Effects of maternal undernutrition on the growth, development and antioxidant status of ovine placentome subtypes during late pregnancy. **Theriogenology**. v. 110, p. 96-102, April, 2018.

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

LUCAS, A. et al. Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. **BMJ**. v.300 n.9, p.837-40, 1990.

LUCAS, A. et al. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. **BMJ**. v.317, n.10, p.1481-7, 1998.

LUMBERS, E.R. Exercise in pregnancy: physiological basis of exercise prescription for the pregnant woman. **J Sci Med Sport**. v.5, n.1, p.20-31, Mar 2002.

LUZARDO, R. 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**, v. 6, n. 7, p. e21232, 2011.

MADANI, S., J. et al. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. **Nutrition**. v. 16, n. 5, p. 368-375, 2000.

MALAFIA, D. C. E. C. G. C. L. A. T. B. G. G. Effects of short-term malnutrition in rats. **SCIENTIA PLENA**, v. 10, n. 7, 2014.

MARTIN, H.; GENNSER, G.; NORMAN, M. Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-year-old children with low birthweight. **Circulation**. v.102, p. 2739–2744, 2000.

MARTYN, C. N. GREENWALD, S. E. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. **Lancet**. v. 350, p. 953–955, 1997.

McCANCE, R.A. Food, growth, and time. **Lancet**. v.2, p.671-6, Abr 1962.

MEDEIROS, M.C. et al. History of Regional Basic Diet (RBD) - a dietary model of experimental malnutrition. **Neurobiology**, v.71, n.2, p. 53-70, 2008.

MELLEN, N. M.; THOBY-BRISSON, M. Respiratory circuits: development, function and models. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, n. 4, p. 676-85, Aug 2012.

MESQUITA, F.F. et al. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. **Braz J Med Biol Res**. v. 43, p. 1010-1018, 2010.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MORAES, D. J. et al. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **J. Physiol**. v. 592, n. 9, p. 2013–2033. 2014.

[MOURADIAN, G. C.](#); FORSTER, H. V.; HODGES, M. R. Acute and chronic effects of carotid body denervation on ventilation and chemoreflexes in three rat strains. **J Physiol**, v.15, .n 14, p.590, May 2012.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v.384, n.8, p. 766–781, nov 2014.

OZANNE, S. E.; JENSEN, C. B. et al. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**, v. 48, n. 3, p. 547- 552, 2005.

PARK, K. S. et al. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J Nutr**, v. 133, n.10, p. 3085-3090, 2003.

PENG, Y. J., J. NANDURI, et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF-2alpha) heterozygous-null mice exhibit exaggerated carotid body sensitivity to hypoxia, breathing instability, and hypertension. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 108, n.7, p. 3065-3070, 2011.

PENITENTE, A.R. et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sci**, v.81, n.2, p.609-14, 2007.

PERKINS, C. C. et al. Physical activity and fetal growth during pregnancy. **Obstet Gynecol**. v. 109, n.1, p.81-7, 2007.

PIRES-DE-MELO IH, WANDERLEY DOS REIS F, LUZ LS, PAZ ST, SILVA HJ, SOUZA SL, et al. Short- and long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the morphology of the larynx. **Nutrition**. ;25(7-8):855-60, 2009.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-177, Jan 17 1998.

RAVELLI, A. C. et al. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 5, p. 811-816, Nov 1999.

REBELATO, H.J. Gestational protein restriction induces alterations in placental morphology and mitochondrial function in rats during late pregnancy. **J Mol Histol**, v.44, p.629-637, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. N. 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROMO, A. CARCELLER, R. TOBAJAS, J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology . **Pediatr Endocrinol Rev**, v.3, p. 332-336, 2009.

SAID, M. A.; PETTIFOR, J.M.; NORRIS, N.A. Life History theory hypotheses on child growth: Potential implications for short and long-term child growth, development and health. **Am J Phys Anthropol**. 2018;165:4–19

SALDIVA, S.R.D.M. et al. Prevalence of obesity in preschool children from five towns in São Paulo State, Brazil. **Cad Saúde Públ**, v. 20, p.1627-32, 2004.

SANTANA MUNIZ, G. et al. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. **Physiol Behav**, v. 129, p. 1-10, Apr 22 2014.

SAWAYA, AL. Et al. Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. **Obes Res**, v.3, p.107-15, 1995.

SAWAYA, AL. et al. The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. **Nutr Rev**, v. 61, p.168-75, 2003.

SICHERI, R. et al. Nutritional status of children and occupational categories of the family in a rural community of Parana, Brazil. **Cad Saúde Públ**, v.9, p. 28-35, 1993.

SIMMS, A. E. et al. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? **J Physiol**, v. 587, n. Pt 3, p. 597-610, Feb 1 2009.

SOUZA, L. V. et al. Birth Weight and Its Relationship with the Cardiac Autonomic Balance in Healthy Children. **PLOS ONE**, v. 21, n. 1, Jan 2017.

SKILTON, M. R, et al. High birth weight is associated with obesity and increased carotid wall thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 34, p. 1064–1068, 2014.

WASINSKI, F. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. **Nutr Metab**, v.12, p.56. Dezembro 2015.

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

WELLS, J.C. Life history trade-offs and the partitioning of maternal investment: Implications for health of mothers and offspring. [Evol Med Public Health](#). V. 16, n.1, p. 153-166, Aug 2018.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, n.5, p.1388-1392, Mar 1986.

WEST-EBERHARD, M. J. **Phenotypic plasticity and the origins of diversity** **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, p. 249-278, 1989.

World Health Organization (WHO). Global Health Observatory in Nutrition - Child Malnutrition: Children aged <5 years overweight, 2008a. Acessado em: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=2469>, às 22:00, 07/09/2012.

WIJNHOFEN, VAN RAAIJ et al. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative 2008: weight, height and body mass index in 6-9-year-old children. [Pediatr Obes](#), V. 8, n.2, p.79-97, Apr 2013.

WOLFE, L. A.; WEISSGERBER, T. L. Clinical physiology of exercise in pregnancy: a literature review. **J ObstetGynaecol**, v. 25, n. 6, p. 473-83, Jun 2003.

TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch Latinoam Nutr**, v. 40, p. 533-47, 1990.

TEZINI, G. C. et al. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 2, p. 147-153, 2013.

THIPPESWAMY, T; CHIKKEGOWDA, P. Basic Risk Factors Awareness in Non-Communicable Diseases (BRAND) Study Among People Visiting Tertiary Care Centre in Mysuru, Karnataka. **J Clin Res Diagn**, v. 10, n.4, p.OC04–OC07. Apr 2016.

ZOCCAL, D. B. et al. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. **Exp Physiol**, v. 94, n. 9, p. 972-83, Sep 2009.

ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 3, p. 229-36, Jun 2011.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL

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 . 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 . 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 .

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 . Maternal protein restriction (8% casein) during gestation and lactation induced high respiratory frequency (RF) and respiratory chemosensitivity to O_2/CO_2 . The sympathetic-respiratory overactivity and amplified peripheral chemoreceptor responses were seen in juvenile rats (30 days) submitted to perinatal protein restriction . 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 and the expression of purinergic receptors (P2X) . Indeed, increased HIF-1 α expression was previously observed in the heart and brain of protein-restricted animals . P2X receptors contribute to increased CB activity and its blockade may induce an antihypertensive effect . Our previous study showed that early CB removal normalized RF and sympathetic nervous activity . 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) .

Specific “re-programming” interventions, such as physical activity, may mitigate or even prevent maternal protein restriction-programmed metabolic disease . Increasing physical activity is one of the recommendations of the World Health Organization and it is considered a broadly reachable, inexpensive, and effective intervention . A meta-analysis included 13 prospective studies and showed an inverse dose–response association between levels of physical activity and risk of hypertension . 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 . 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 .

An experimental model of maternal physical activity has been developed to describe physiological adaptations for mother and offspring . 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 . 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 . 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 . 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.

1. Results

1.1. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. Indeed, perinatal malnourished rats display an increased sympathetic and bradycardic response to activation of peripheral chemoreceptors O₂/CO₂ and carotid bodies. 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) and vascular remodeling-induced exercise in the placenta. These observations add support to the view that maternal physical exercise acts 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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%). A recent study showed overexpression of HIF-1 α in the CB of malnourished rats that were 30 days old. 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. Although the purinergic signaling at CB has been implicated in the cardiorespiratory dysfunction in some hypertensive models, no changes were observed in the expression of their main receptors at

CB o 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 . 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 . The carotid body and sensory and autonomic nerve fibers express tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme of dopamine synthesis . 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 . 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 n° 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. 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. 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). A stainless steel wheel (27 cm diameter) was placed into the cage for running physical activity with food and water *ad libitum*. A wireless cyclocomputer (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.

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 anesthetized 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. 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), 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>) . 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 . 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 .

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.

. 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.

1. Nuyt, A. M., Alexander, B. T. Developmental programming and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2009;**18**,144-52. Epub 2009/05/13.
2. Victora, C. G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P. C., Martorell, R., Richter, L., et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008;**371**,340-57.
3. de Brito Alves, J. L., de Oliveira, J. M., Ferreira, D. J., de Barros, M. A., Nogueira, V. O., Alves, D. S., 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.
4. Lorite Mingot, D., Gesteiro, E., Bastida, S., Sanchez-Muniz, F. J. Epigenetic effects of the pregnancy Mediterranean diet adherence on the offspring metabolic syndrome markers. *J Physiol Biochem*. 2017;**73**,495-510.
5. Hrolfsdottir, L., Halldorsson, T. I., Rytter, D., Bech, B. H., Birgisdottir, B. E., Gunnarsdottir, I., et al. Maternal Macronutrient Intake and Offspring Blood Pressure 20 Years Later. *J Am Heart Assoc*. 2017;**6**.
6. Huxley, R. R., Shiell, A. W., Law, C. M. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens*. 2000;**18**,815-31.
7. Costa-Silva, J. H., de Brito-Alves, J. L., Barros, M. A., Nogueira, V. O., Paulino-Silva, K. M., de Oliveira-Lira, 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.
8. de Brito Alves, J. L., Costa-Silva, J. H. Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2018;**45**,422-9. Epub 2017/11/23.
9. de Brito Alves, J. L., Nogueira, V. O., de Oliveira, G. B., da Silva, G. S., Wanderley, A. G., Leandro, C. G., et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O(2)/CO(2) chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *The British journal of nutrition*. 2014;**111**,606-15.
10. Barros, M. A., De Brito Alves, J. L., Nogueira, V. O., Wanderley, A. G., Costa-Silva, J. H. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;**25**,123-30.
11. de Brito Alves, J. L., Nogueira, V. O., Cavalcanti Neto, M. P., Leopoldino, A. M., Curti, C., Colombari, D. S., et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J Nutr*. 2015;**145**,907-14.
12. Prabhakar, N. R., Peng, Y. J., Kumar, G. K., Nanduri, J. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Comprehensive Physiology*. 2015;**5**,561-77. Epub 2015/04/17.
13. Rong, W., Gourine, A. V., Cockayne, D. A., Xiang, Z., Ford, A. P., Spyer, K. M., et al. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;**23**,11315-21. Epub 2003/12/16.
14. Burnstock, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in pharmacology*. 2017;**8**,661. Epub 2017/10/11.
15. Ito, T., Funamoto, K., Sato, N., Nakamura, A., Tanabe, K., Hoshiai, T., et al. Maternal undernutrition induces the expression of hypoxia-related genes in the fetal brain. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2012;**226**,37-44. Epub 2011/12/22.
16. Ito, T., Tanabe, K., Nakamura, A., Funamoto, K., Aoyagi, A., Sato, K., et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in the fetal heart is associated with maternal undernutrition. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2011;**224**,163-71. Epub 2011/06/15.

17. Pijacka, W., Moraes, D. J., Ratcliffe, L. E., Nightingale, A. K., Hart, E. C., da Silva, M. P., et al. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nature medicine*. 2016;**22**,1151-9.
18. 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.
19. Fidalgo, M., Falcao-Tebas, F., Bento-Santos, A., de Oliveira, E., Nogueira-Neto, J. F., de Moura, E. G., 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. *The British journal of nutrition*. 2013;**109**,449-56. Epub 2012/06/22.
20. Leandro, C. G., Fidalgo, M., Bento-Santos, A., Falcao-Tebas, F., Vasconcelos, D., Manhaes-de-Castro, R., 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. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;**2012**,805418.
21. Lopez-Olmedo, N., Hernandez-Cordero, S., Neufeld, L. M., Garcia-Guerra, A., Mejia-Rodriguez, F., Mendez Gomez-Humaran, I. The Associations of Maternal Weight Change with Breastfeeding, Diet and Physical Activity During the Postpartum Period. *Maternal and child health journal*. 2016;**20**,270-80. Epub 2015/11/04.
22. Huai, P., Xun, H., Reilly, K. H., Wang, Y., Ma, W., Xi, B. Physical activity and risk of hypertension: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Hypertension*. 2013;**62**,1021-6. Epub 2013/10/02.
23. Cornelissen, V. A., Fagard, R. H. Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*. 2005;**23**,251-9.
24. Wang, C., Wei, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Xu, Q., Sun, 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*. 2017;**216**,340-51.
25. Magro-Malosso, E. R., Saccone, G., Di Tommaso, M., Roman, A., Berghella, V. Exercise during pregnancy and risk of gestational hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;**96**,921-31.
26. Ferrari, N., Graf, C. [Recommendations for Physical Activity During and After Pregnancy]. *Gesundheitswesen*. 2017;**79**,S36-S9. Bewegungsempfehlungen für Frauen während und nach der Schwangerschaft.
27. Fragoso, J., Lira, A. O., Chagas, G. S., Lucena Cavalcanti, C. C., Beserra, R., de Santana-Muniz, G., et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. *Experimental physiology*. 2017.
28. Santana Muniz, G., Beserra, R., da Silva Gde, P., Fragoso, J., Lira Ade, O., Nascimento, E., et al. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. *Physiology & behavior*. 2014;**129**,1-10.
29. Marcelino, T. B., de Lemos Rodrigues, P. I., Klein, C. P., Santos, B. G., Miguel, P. M., Netto, C. A., et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. *Behav Brain Res*. 2016;**312**,30-8.
30. Fragoso, J., Lira, A. O., Chagas, G. S., Lucena Cavalcanti, C. C., Beserra, R., de Santana-Muniz, G., et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. *Experimental physiology*. 2017;**102**,1486-99. Epub 2017/08/24.
31. Blessen, C. S., Chinnathambi, V., Kumar, S., Yallampalli, C. Gestational Protein Restriction Impairs Glucose Disposal in the Gastrocnemius Muscles of Female Rats. *Endocrinology*. 2017;**158**,756-67.
32. Bharadwaj, S., Ginoya, S., Tandon, P., Gohel, T. D., Guirguis, J., Vallabh, H., et al. Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2016;**4**,272-80.
33. Taylor, P. D., Samuelsson, A. M., Poston, L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin. *Acta physiologica*. 2014;**210**,508-23.

34. Menuet, C., Wlodek, M. E., Fong, A. Y., Allen, A. M. Respiratory modulation of sympathetic nerve activity is enhanced in male rat offspring following uteroplacental insufficiency. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016;**226**,147-51.
35. Mangwiro, Y. T. M., Cuffe, J. S. M., Briffa, J. F., Mahizir, D., Anevska, K., Jefferies, A. J., 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.
36. Kramer, J. M., Beatty, J. A., Plowey, E. D., Waldrop, T. G. Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;**29**,122-6.
37. Parati, G., Saul, J. P., Di Rienzo, M., Mancia, G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension.* 1995;**25**,1276-86.
38. Horsman, H. M., Peebles, K. C., Tzeng, Y. C. Interactions between breathing rate and low-frequency fluctuations in blood pressure and cardiac intervals. *Journal of applied physiology.* 2015;**119**,793-8.
39. Semenza, G. L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* 2007;**405**,1-9.
40. Lee, S. H., Wolf, P. L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S. W., Thistlethwaite, P. A. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *The New England journal of medicine.* 2000;**342**,626-33. Epub 2000/03/04.
41. Misawa, R., Girotti, P. A., Mizuno, M. S., Liberti, E. A., Furness, J. B., Castelucci, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons. *World J Gastroenterol.* 2010;**16**,3651-63.
42. Leonard, E. M., Salman, S., Nurse, C. A. Sensory Processing and Integration at the Carotid Body Tripartite Synapse: Neurotransmitter Functions and Effects of Chronic Hypoxia. *Frontiers in physiology.* 2018;**9**.
43. Zhang, M., Vollmer, C., Nurse, C. A. Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current Ih in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture. *The Journal of physiology.* 2017;**12**.
44. Zhao, L., Zhuang, J., Gao, X., Ye, C., Lee, L. Y., Xu, F. From the Cover: Prenatal Nicotinic Exposure Attenuates Respiratory Chemoreflexes Associated With Downregulation of Tyrosine Hydroxylase and Neurokinin 1 Receptor in Rat Pup Carotid Body. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 2016;**153**,103-11.
45. Bialkowska, M., Zajac, D., Mazzatenta, A., Di Giulio, C., Pokorski, M. Inhibition of peripheral dopamine metabolism and the ventilatory response to hypoxia in the rat. *Advances in experimental medicine and biology.* 2015;**837**,9-17.
46. Nurse, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *The Journal of physiology.* 2014;**592**,3419-26. Epub 2014/03/26.
47. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition.* 1993;**123**,1939-51. Epub 1993/11/01.
48. Malan, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respiration physiology.* 1973;**17**,32-44. Epub 1973/01/01.
49. Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F., Cerutti, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation.* 1991;**84**,482-92. Epub 1991/08/01.
50. Bernardi, L., Porta, C., Gabutti, A., Spicuzza, L., Sleight, P. Modulatory effects of respiration. *Autonomic neuroscience : basic & clinical.* 2001;**90**,47-56. Epub 2001/08/04.
51. Tezini, G. C., Dias, D. P., Souza, H. C. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. *Experimental gerontology.* 2013;**48**,147-53. Epub 2012/12/04.
52. Porta, A., Tobaldini, E., Guzzetti, S., Furlan, R., Montano, N., Gneccchi-Ruscone, T. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2007;**293**,H702-8. Epub 2007/02/20.

Figures and Legend

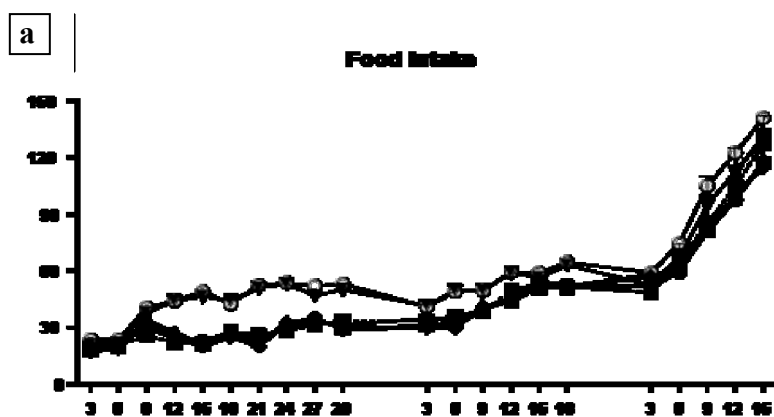


Figure 1. Food Intake during 30 days of adaptation, pregnancy and lactation. During adaptation and pregnancy periods, groups were constituted by NP (n=6), LP (n=6), NP-inactive (n=6), NP-active (n=6), LP-inactive (n=6) and LP-active (n=6). The values are presented as the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$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

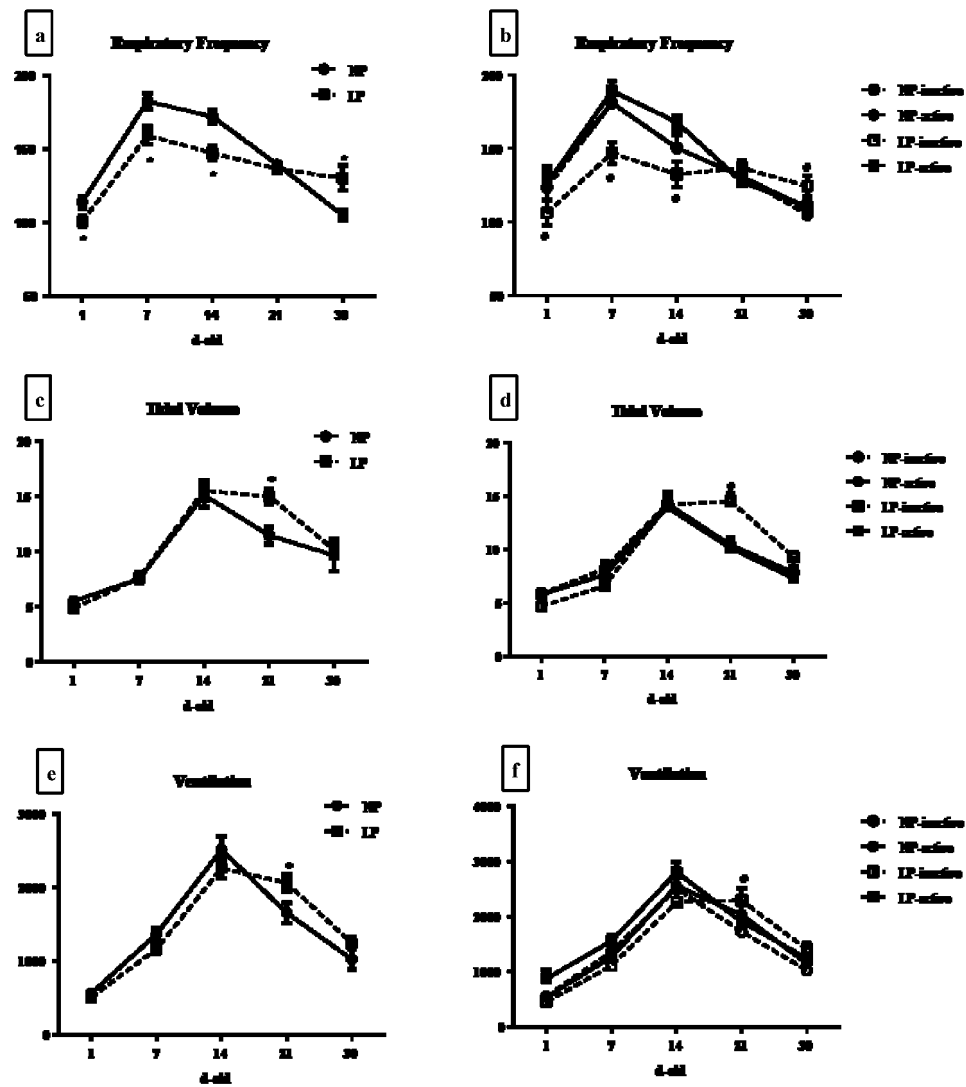


Figure 2. Ventilatory parameters (respiratory frequency - FR, tidal volume - VT and ventilation - VE) of offspring of rats at 1, 7, 14, 21 and 30 days old. The groups included NP (n=8), LP (n=8), NP-inactive (n=8), NP-active (n=8), LP-inactive (n=8) and LP-active (n=8). A, C and E show the ventilatory 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).

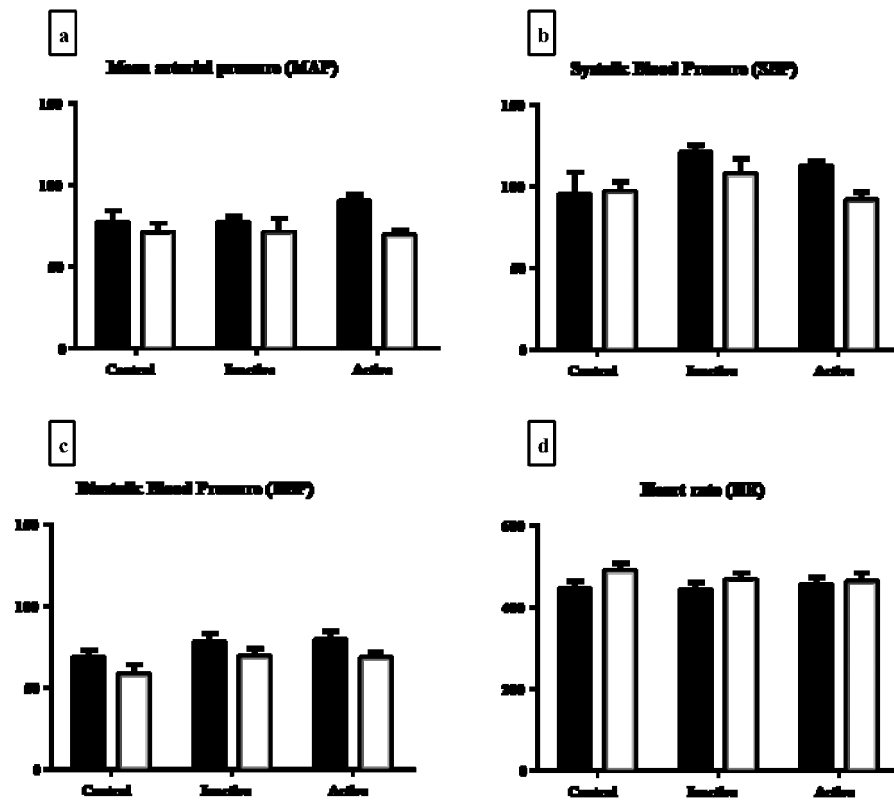


Figure 3. Cardiac parameters (A, mean arterial pressure – PAM, B, systolic blood pressure – SBP, C, diastolic blood pressure – DBP and D, heart rate - HR) of offspring of rats, at 30 days old. The groups were constituted by NP (n=8), LP (n=8), NP-inactive (n=8), NP-active (n=8), LP-inactive (n=8) and 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.

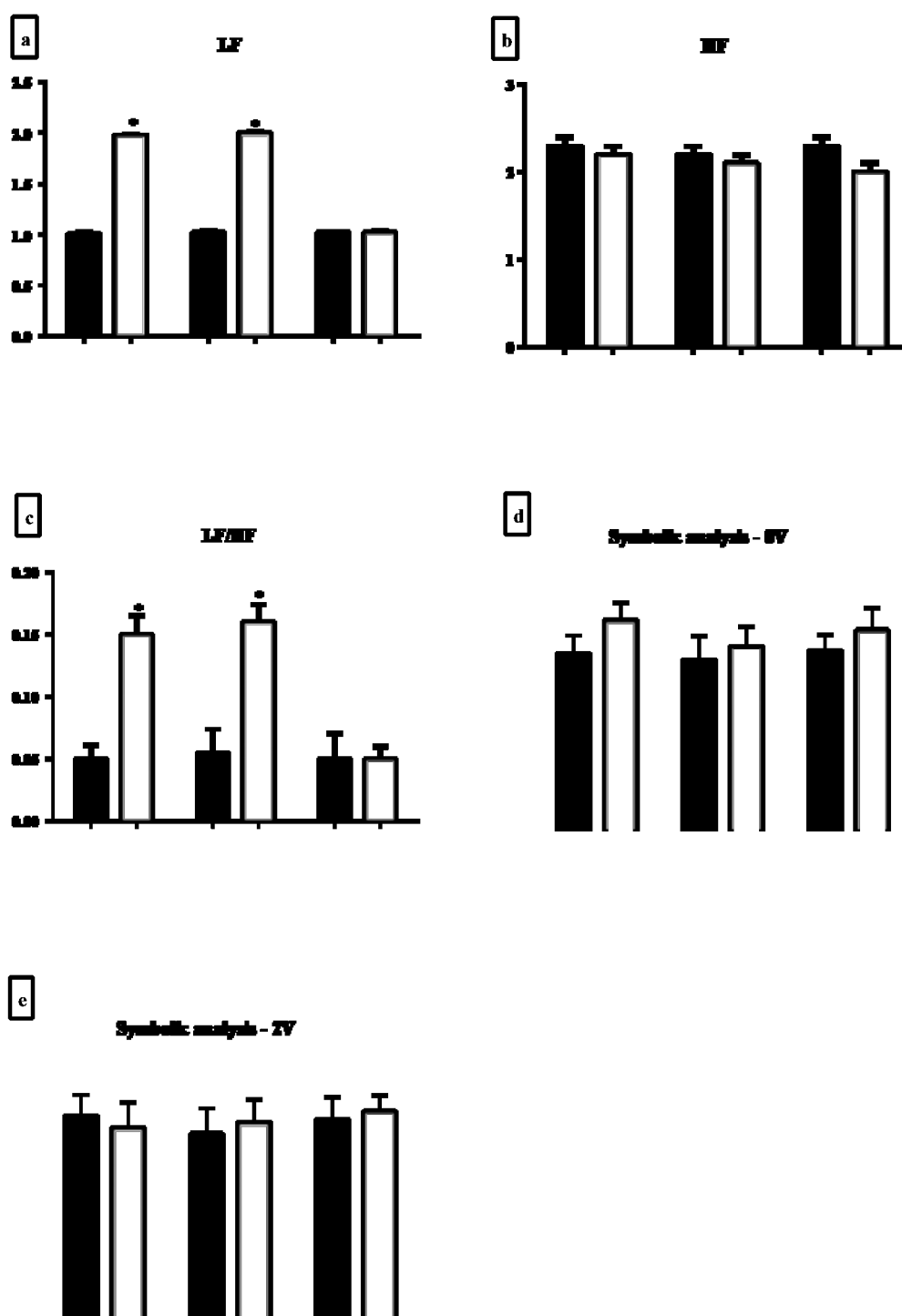


Figure 4. Cardiovascular variability of the systolic pressure (PS). The low-frequency bands – LF (A), high-frequency bands – HF (B), ratio LF/HF (C), nonlinear heart rate variability of the 0V sequences (D) and nonlinear heart rate variability of the 2V sequences (E) of offspring of rats, at 30 days old, from mothers submitted to a normoprotein diet (NP, 17% protein, n=8) or low-protein 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).

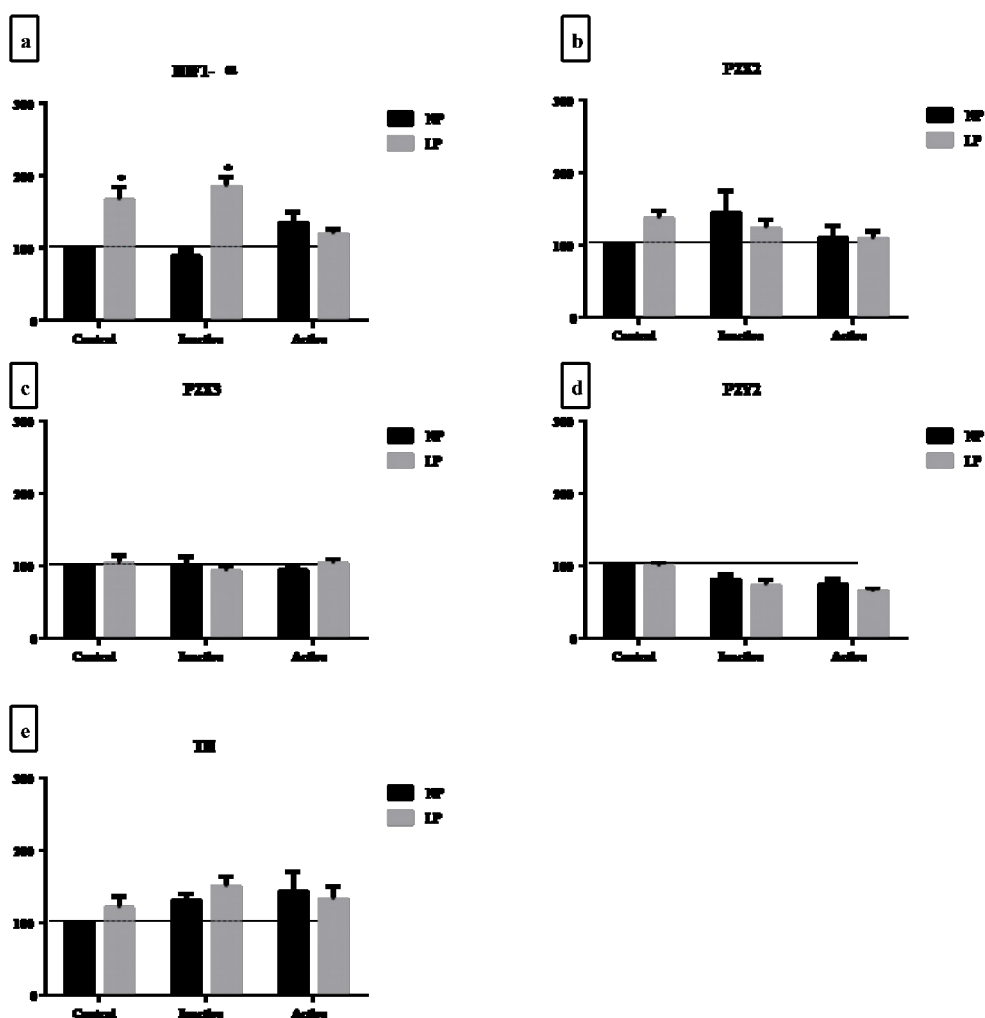


Figure 5. Expression of HIF-1 α (A), P2X2 (B), P2X3 (C), P2Y2 (D) and TH (E) in CB of offspring of rats, at 30 days old, from mothers submitted to a normoprotein diet (NP, 17% protein, n=5) or low-protein diet (LP, 8% protein, n=5) during pregnancy and lactation. And from mothers that performed voluntary physical activity (NP-inativo, n=5, NP-active, n=5, LP-inativo, 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*	AIN-93G*	
	g/100g	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%

*

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	6	0	0	0
Inactive	6	≤ 1	≤ 10.0	≤ 20.0
Active	6	$> 1.0 \leq 5.00$	$> 10.0 \leq 40.0$	$> 20.0 \leq 120.0$

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).