



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

**ALLIFER ROSENDO PEREIRA**

**IMPLICAÇÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE O  
METABOLISMO DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATOS JUVENIS  
SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO ATIVIDADE FÍSICA E**  
**PLASTICIDADE FENOTÍPICA**

**ALLIFER ROSENDO PEREIRA**

**IMPLICAÇÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE O**  
**METABOLISMO DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATOS JUVENIS**  
**SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica

**Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes**  
**Coorientadora: Claudia Jacques Lagranha**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

**2022**

Catálogo na Fonte  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecário Jonatan Cândido, CRB-4/2292

P436i Pereira, Allifer Rosendo.  
Implicações do treinamento físico moderado sobre o metabolismo de tecido adiposo branco de ratos juvenis submetidos à restrição proteica materna / Allifer Rosendo Pereira - Vitória de Santo Antão, 2022.  
82 f.; il., tab.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.  
Coorientadora: Claudia Jacques Lagranha.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica - PPGNAFPF, 2022.  
Inclui referências e anexos.

1. Deficiência de proteína. 2. Tecido adiposo branco. 3. Dieta cetogênica. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Lagranha, Claudia Jacques (Coorientadora). III. Título.

616 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE - 005/2023

ALLIFER ROSENDO PEREIRA

**IMPLICAÇÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE O  
METABOLISMO DE TECIDO ADIPOSE BRANCO DE RATOS JUVENIS  
SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Aprovado em: 22/02/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Jacques Lagranha (Membro interno)  
Núcleo de Educação Física e Ciencias do Esporte do CAV/ UFPE

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira (Membro interno)  
Núcleo de Nutrição do CAV/UFPE

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Diorginis José Soares Ferreira (Membro externo)  
Núcleo de Educação Física da UNIVASF

Dedico este trabalho aos meus pais, minhas irmãs e a minha querida esposa por toda paciência, amor e incentivo incondicional, e em especial aos meus queridos avós (*in memoriam*), obrigado por tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo agradeço ao meu bom Deus, que sempre me conduziu pelo caminho da luz, sou extremamente grato pelas oportunidades e pelo dom da vida.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, seu Adalberto Jr e dona Maria de Lourdes, obrigado por todo cuidado, carinho e amor durante toda minha existência. As minhas irmãs Talyne, Tafnis e Kely, minhas companheiras de longas datas, obrigado por tudo que vivemos até aqui, aos meus queridos e amados avós, aos meus tios e primos, obrigado por toda a torcida e apoio. E o meu mais profundo agradecimento a minha querida e amada esposa, Renata Santos. Obrigado por acreditar quando nem eu mesmo acreditava, obrigado por toda paciência do mundo, obrigado por me apoiar nos momentos mais difíceis ao longo dos últimos nove anos, obrigado por ser minha maior fonte de inspiração, obrigado por tudo, sem você nada seria possível.

A minha querida e estimada orientadora, professora Mariana Fernandes, obrigado pela oportunidade no começo de tudo isso, tenho certeza de que não poderia contar com uma pessoa melhor pra me auxiliar durante todo esse processo, tive a imensa sorte de caminhar ao seu lado durante os últimos anos, muito obrigado. A minha co-orientadora, professora Claudia Lagranha, obrigado por todo companheirismo e ajuda durante minha curta jornada acadêmica. Vocês são um grande exemplo de profissionais, as levarei em meu coração com os melhores sentimentos, muito obrigado.

Aos meus grandes amigos e companheiros de LABMEX (sem dúvidas o melhor lugar da UFPE e arredores). Me faltam palavras pra descrever a importância de cada um de vocês até esse presente momento, obrigado por fazerem do nosso ambiente de trabalho um lugar de extrema paz, alegria e amor. Agradeço em especial aos meninos que me receberam quando eu ainda era um candidato ao posto de aluno de iniciação científica, obrigado por todo apoio ao longo dos anos Anderson, Rudá, Talitta, Cássia, Diorginis, obrigado por toda referência e apoio. Aos queridos amigos e contemporâneos Nilson, “Will”, “Dani”, Idelfonso, Flavia, Ramon, Leticia, Giseli e Welliton dividir experiências com vocês foi sensacional. Aos recém-chegados, em

especial a Osmar, Jhonatans e Guilherme que colaboraram com este trabalho e a todos os demais que compõem a família LABMEX meu muito obrigado, vocês fazem parte da minha história.

Aos meus queridos amigos fica o meu mais sincero agradecimento por todo apoio e torcida durante os últimos anos, em especial a Edmo Filho, um cara extremamente do bem e que de forma incrível me deu muito apoio de todas as formas possíveis, muito obrigado por toda paciência e compreensão.

Por fim, agradeço aos meus queridos colegas de graduação e mestres que tive ao longo da minha trajetória acadêmica, meu muito obrigado. Agradeço também as minhas colegas de pós-graduação, estivemos virtualmente juntos em um momento extremamente delicado, mas conseguimos finalizar com muito êxito e esforço. Aos mestres e professores do PPGNAFPF, meu muito obrigado.

## RESUMO

O ambiente nutricional implica em importantes consequências para a saúde em diferentes fases da vida, sobretudo nos períodos iniciais afetando o desenvolvimento de uma série de tecidos, como o adiposo. O tecido adiposo é um órgão metabolicamente dinâmico e ativo e o comprometimento de suas funções fisiológicas está diretamente associado a condições patológicas. Por outro lado, o exercício físico moderado é apontado como um modulador positivo do metabolismo, sendo ele uma estratégia para combater o surgimento e/ou progressão de doenças crônicas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar as implicações do treinamento físico moderado sobre o metabolismo do tecido adiposo branco de ratos submetidos a restrição proteica durante períodos críticos do desenvolvimento. Inicialmente, ratas *Wistar* receberam dietas com níveis normais de proteína (dieta controle-C, proteína 17%) ou com baixo teor de proteína (hipoproteica-HP, proteína 8%), durante a gestação e a lactação. Após o desmame, todos os grupos receberam dieta C até o sacrifício, aos 60 dias. A prole foi submetida ao teste de execução aeróbia incremental no 26º, 27º e 28º dias e subdividida em quatro grupos de acordo com a prática ou não do treinamento físico moderado. Foram obtidos os seguintes grupos experimentais: Controle não treinado (CNT); Controle Treinado (CT); Hipoproteico não treinado (HPNT) e Hipoproteico treinado (HPT). Aos 30 dias de vida, os animais dos grupos CT e HT foram submetidos a um programa de treinamento físico (60 min/dia, 5 dias/semana, durante 4 semanas). Aos 60 dias de vida, os machos foram eutanasiados e tiveram o tecido adiposo epididimal removido para as análises. Nossos resultados mostraram que restrição proteica nos períodos iniciais da vida altera a estrutura morfológica dos adipócitos, comprometendo o metabolismo oxidativo, além de alterar a expressão de genes relacionados ao metabolismo energético através de mecanismos compensatórios. Em contraste, o programa de exercício físico regulou a adipogênese, o metabolismo oxidativo e a expressão genica e proteica da AMPK, atenuando os efeitos deletérios da restrição proteica no metabolismo energético. Além disso, foi elaborado um artigo de Revisão Sistemática intitulado “Efeitos da desnutrição proteica durante o período perinatal no desenvolvimento e metabolismo do tecido adiposo branco: uma revisão sistemática”, devidamente registrado no Prospective International Registry of Systematic Reviews (PROSPERO), com registro código: CRD42021243228. Assim, nossos achados sugerem que o exercício físico moderado pode ser uma importante ferramenta terapêutica não farmacológica contra os efeitos deletérios de uma dieta restrita em proteínas nos períodos iniciais da vida sobre o metabolismo energético.

**Palavras-chave:** desnutrição proteica; gestação; lactação; exercício; tecido adiposo branco.

## **ABSTRACT**

The nutritional environment has important consequences for health at different stages of life, especially in the early stages, affecting the development of a series of tissues, such as adipose tissue. Adipose tissue is a metabolically dynamic and active organ and the impairment of its physiological functions is directly associated with pathological conditions. On the other hand, moderate physical exercise is seen as a positive modulator of metabolism, being a strategy to combat the onset and/or progression of chronic diseases. Thus, the aim of this study was to investigate the implications of moderate physical training on the white adipose tissue metabolism of rats subjected to protein restriction during critical periods of development. Initially, Wistar rats were fed diets with normal levels of protein (control-C diet, 17% protein) or low-protein (hypoprotein, 8% protein) during pregnancy and lactation. After weaning, all groups received diet C until sacrifice, at 60 days. The offspring were submitted to the incremental aerobic execution test on the 26th, 27th and 28th days and subdivided into four groups according to the practice or not of moderate physical training. The following experimental groups were obtained: Untrained control (UC); Trained Control (TC); Untrained hypoproteic (UHP) and trained hypoproteic (THP). At 30 days of life, the animals in the TC and THP groups were submitted to a physical training program (60 min/day, 5 days/week, for 4 weeks). At 60 days of life, the males were euthanized and had the epididymal adipose tissue removed for analysis. Our results showed that protein restriction in the early periods of life alter the morphological structure of adipocytes, compromising oxidative metabolism, in addition to altering the expression of genes related to energy metabolism through compensatory mechanisms. In contrast, the physical exercise program regulated adipogenesis, oxidative metabolism and AMPK gene and protein expression, attenuating the deleterious effects of the protein restriction on the energy metabolism. In addition, a Systematic Review article was prepared entitled "Effects of protein malnutrition during the perinatal period on the development and metabolism of white adipose tissue: a systematic review", duly registered in the Prospective International Registry of Systematic Reviews (PROSPERO), with registration code: CRD42021243228. Thus, our findings suggest that the moderate physical exercise may be an important non-pharmacological therapeutic tool against the deleterious effects of a protein-restricted diet in early life on energy metabolism.

**Keywords:** protein malnutrition; gestation; lactation; exercise; white adipose tissue

## SUMÁRIO

|                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                     | <b>11</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                          | <b>13</b> |
| <b>2.1 Períodos críticos do desenvolvimento, nutrição no início da vida e suas consequências sobre o tecido adiposo .....</b> | <b>13</b> |
| <b>2.2 Tecido adiposo .....</b>                                                                                               | <b>15</b> |
| <i>2.2.1 Origem e desenvolvimento.....</i>                                                                                    | <i>15</i> |
| <i>2.2.2 Tecido adiposo como órgão endócrino e metabólico .....</i>                                                           | <i>19</i> |
| <b>2.3 Exercício físico .....</b>                                                                                             | <b>22</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                       | <b>24</b> |
| <b>3.1 Objetivo Geral.....</b>                                                                                                | <b>24</b> |
| <b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>                                                                                        | <b>24</b> |
| <b>4 ARTIGO .....</b>                                                                                                         | <b>25</b> |
| <b>5 ARTIGO .....</b>                                                                                                         | <b>40</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                      | <b>69</b> |
| <b>ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE.....</b>                                           | <b>78</b> |
| <b>ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO COMO COLABORADOR .....</b>                                                                      | <b>79</b> |
| <b>ANEXO C - REGISTRO DO PROTOCOLO DE REVISÃO SISTEMÁTICA .....</b>                                                           | <b>80</b> |
| <b>ANEXO D - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA.....</b>                                                                          | <b>81</b> |
| <b>ANEXO E - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA.....</b>                                                                          | <b>82</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O ambiente nutricional implica em importantes consequências para a saúde, em diferentes fases da vida, porém a desnutrição durante os períodos de gestação e lactação representa um ponto crítico para a saúde a médio e a longo prazo. Em virtude de alterações em mecanismos metabólicos no feto responsáveis por reorganizar o suprimento de nutrientes, direcionando-os para órgãos de maior importância, como o cérebro, em detrimento de outros (FERNANDEZ-TWINN; OZANNE; BEHAVIOR, 2006). A restrição de nutrientes para certos órgãos durante períodos críticos do desenvolvimento pode alterar sua morfologia e/ou função, contribuindo diretamente para o surgimento e desenvolvimento de algumas doenças, como as cardiovasculares e metabólicas na idade adulta, tal como é abordado na teoria da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (BARKER, 2002; MCMILLEN; ROBINSON, 2005).

Tradicionalmente, o papel atribuído ao tecido adiposo é o de armazenar energia, liberando ácidos graxos para servir como combustível quando necessário, entretanto a descoberta de um hormônio denominado leptina que atua principalmente nos neurônios hipotalâmicos regulando a saciedade e outras funções, e de várias outras substâncias biologicamente ativas com ação local e/ou sistêmica denominadas adipocinas, tem mostrado que o tecido adiposo atua como órgão endócrino diretamente sobre o balanço energético mudando a perspectiva pela qual o tecido adiposo era visto (ZHANG et al., 1994; CINTI, 2005; FRIEDMAN, 2019). Atualmente o tecido adiposo não é mais visto como um órgão que simplesmente armazena energia, uma vez que ele também atua como órgão metabolicamente dinâmico e importante (OIKONOMOU; ANTONIADES, 2019).

A restrição proteica materna é uma das principais causas de comprometimento do crescimento intrauterino, que por sua vez está associado ao desenvolvimento de doenças como diabetes do tipo 2 e hipertensão (BATESON *et al.*, 2004). Através de pesquisas em modelo animal, Ozanne e colaboradores (2001) propuseram que a resistência à insulina observada em animais adultos submetidos a restrição proteica nos períodos iniciais da vida, está associada à diversos órgãos envolvidos no metabolismo energético tais como pâncreas, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (OZANNE, 2001). A função prejudicada do tecido adiposo é causada pela interação de fatores genéticos, comportamentais e ambientais e envolvem prejuízos

nas características morfológicas e funcionais dos adipócitos que estão associadas à prejuízos na saúde metabólica (LAFOREST *et al.*, 2015; KAHN *et al.*, 2019).

A literatura demonstra que a atividade física regular é potencialmente a melhor estratégia no combate ao surgimento e progressão de doenças metabólicas (DAVIS, 2004; BARBOSA *et al.*, 2012). No tecido adiposo branco de indivíduos saudáveis, o exercício físico aumenta a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético, conferindo ao mesmo características de um tecido metabolicamente mais ativo (BOSTRÖM *et al.*, 2012). A importância do tecido adiposo como um órgão chave para diversas funções orgânicas aumentou o interesse de pesquisas sobre os efeitos deletérios da restrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento, no entanto são escassos os estudos que propõem intervenções terapêuticas, tais como exercício físico, o que fortalece a importância do presente trabalho. A realização desse estudo possibilitará um melhor entendimento sobre mecanismos envolvidos no surgimento de doenças crônico-metabólicas, e fornece dados científicos sobre as repercussões do treinamento físico moderado sobre o metabolismo de tecido adiposo branco de ratos juvenis submetidos à restrição proteica materna.

O desenvolvimento dessa dissertação levou a estruturação de um artigo de revisão sistemática intitulado “Effects of protein malnutrition during the perinatal period on the development of adipose tissue in rats: a systematic review”, o qual será submetido para publicação na revista “*Journal of Developmental Origins of health and Disease*”, com fator de impacto 2.4 e Quallis A3 em Nutrição, como também um artigo original intitulado “Effects of moderate physical training on adipose tissue metabolism in juvenile rats after perinatal protein restriction”, o qual será submetido para publicação na revista “*British Journal of Nutrition*” com fator de impacto 3.33 e Quallis A1 em Nutrição.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Períodos críticos do desenvolvimento, nutrição no início da vida e suas consequências sobre o tecido adiposo

O organismo tem a capacidade de modificar suas características morfológicas e funcionais em resposta às circunstâncias ambientais durante todo ciclo da vida, entretanto existem períodos mais sensíveis no que refere-se ao desenvolvimento, denominados de “períodos críticos do desenvolvimento”, sendo assim qualquer alteração durante esses períodos, que correspondem à gestação, lactação e primeira infância, podem repercutir das mais diversas formas sobre o organismo a médio e a longo prazo (GLUCKMAN et al., 2005). Os períodos críticos do desenvolvimento consistem em janelas de rápida proliferação e diferenciação celular, repercutindo diretamente sobre o desenvolvimento de órgãos e tecidos, tornando os mais sensíveis às condições ambientais de modo que insultos pontuais como o consumo nutricional inadequado podem impactar de forma permanente a saúde do indivíduo (DOBBING; SANDS, 1985; LUCAS, 1991).

Em 1986, Barker e Osmond desmontaram a correlação direta entre doenças cardíacas e a má nutrição no início da vida, apresentando o conceito de origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD), abordando como o ambiente no início da vida pode contribuir para o surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas desde a infância até a idade adulta (BARKER; OSMOND, 1986). Assim, entender os mecanismos pelos quais o ambiente químico (pesticidas), físico (poluição do ar), e sobre tudo como aspectos nutricionais, como a desnutrição podem afetar a saúde, tornou-se um grande campo de estudo (DELPIERRE et al., 2016).

A desnutrição é definida como um desequilíbrio energético (excesso ou deficiência) de proteínas e outros nutrientes causando uma série de prejuízos morfológicos e funcionais nos tecidos, podendo comprometer todo o sistema fisiológico na primeira e também na segunda geração (STRATTON; GREEN; ELIA, 2003; PAINTER et al., 2008). Apesar do progresso observado em vários países, através de ações e políticas públicas que buscam erradicar a fome, a desnutrição, sobretudo a materno infantil, ainda é um grande problema para a saúde global, ainda mais no atual contexto da pandemia da COVID-19, onde os pequenos avanços conquistados nas últimas décadas estão fortemente ameaçados (VICTORA et al.,

2021).

Nos últimos anos houve um crescimento no interesse de pesquisas sobre a influência da nutrição materna durante os períodos iniciais da vida e seus possíveis impactos na saúde adulta. Um dos principais trabalhos desenvolvido por Barker e Osmond (1986) demonstrou a associação entre a má nutrição no início da vida com o surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas (BARKER; OSMOND, 1986). Posteriormente outros trabalhos também demonstraram relação entre doenças crônicas como diabetes tipo 2, hipertensão, e doença cardíaca em indivíduos de baixo peso e/ou estatura ao nascer (HALES *et al.*, 1991; HALES; BARKER, 1992; OSMOND *et al.*, 1993; FALL *et al.*, 1995).

A coexistência de alguns fatores de risco cardiovascular como resistência à insulina, dislipidemia aterogênica, hipertensão arterial e obesidade abdominal são denominados de síndrome metabólica ou síndrome “x”, uma condição que está diretamente associada com casos de morbimortalidade, ocorrendo com frequência em indivíduos que apresentaram baixo peso ao nascer, sendo esta uma condição diretamente associada ao surgimento da síndrome metabólica (BARKER *et al.*, 1993; KANE *et al.*, 2017). A síndrome metabólica não é uma doença em si, mas uma definição que destaca um conjunto de distúrbios que aumentam substancialmente os riscos de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2, refletindo no aumento de 1,5 vezes no risco de mortalidade por diversas causas (SAMSON; GARBER; CLINICS, 2014; ENGIN, 2017).

Dentre as razões constantemente associadas ao surgimento da síndrome metabólica, a disfunção do tecido adiposo parece exercer um papel importante e central a partir do aumento da adiposidade, dislipidemia e resistência à insulina (KUMARI *et al.*, 2019). A suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças relacionadas a síndrome metabólica mais tardiamente na vida está fortemente associada à restrição do crescimento intrauterino como resultado de déficits nutricionais (LEJARRAGA, 2019). O ambiente nutricional no início da vida parece alterar certas características morfológicas e funcionais do tecido adiposo o que poderia explicar o papel do mesmo no surgimento e desenvolvimento de distúrbios que afetam a saúde (XITA; TSATSOULIS, 2010; LAKSHMY; DISORDERS, 2013).

A literatura científica apresenta evidências apresentam possíveis mecanismos através dos quais a deficiência nutricional no início da vida sobretudo, a restrição proteica compromete o crescimento e o desenvolvimento do tecido adiposo. A

restrição proteica materna durante a gestação e lactação aumenta a suscetibilidade à adiposidade visceral na prole de ratos adultos, a partir de vias moleculares envolvidas na adipogênese e angiogênese (GUAN *et al.*, 2005). Além disso, altera a distribuição e morfologia do tecido adiposo branco e reduz os níveis das principais proteínas sinalizadoras de insulina (MARTIN GRONET *et al.*, 2016). Foi observado em ratos de mães alimentadas com uma dieta pobre em proteínas durante gestação e lactação adipócitos significativamente menores do que os dos grupos controle (SHEPHERD *et al.*, 1999). Em conjunto, esses dados indicam um comprometimento do tecido adiposo em virtude da restrição proteica no início da vida pode gerar complicações metabólicas na vida adulta.

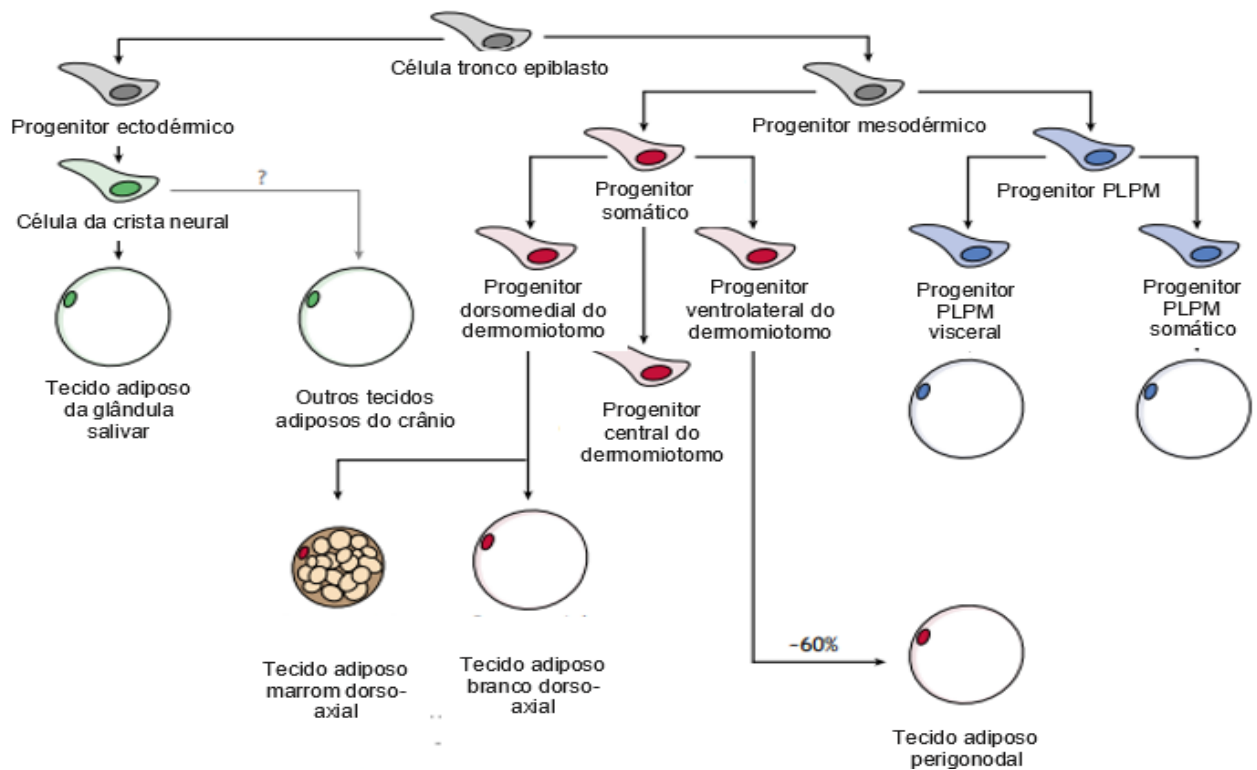
## **2.2 Tecido adiposo**

### *2.2.1 Origem e desenvolvimento*

A compreensão da origem germinativa dos adipócitos foi baseada em análises histológicas anteriores, onde foi postulado que os adipócitos derivavam do tecido conjuntivo mesodérmico (FLEMMING, 1871). Com o passar dos anos, a compreensão das estruturas mais íntimas do mesoderma avançaram possibilitando um conhecimento mais minucioso dessas estruturas e suas respectivas contribuições no desenvolvimento de múltiplos tecidos, dentre eles o tecido adiposo (TA). O mesoderma é subdividido em três compartimentos: somitos, placas laterais e mesoderma intermediário (TAJBAKHSH; SPÖRLE, 1998; KELLER *et al.*, 2004).

O atual entendimento do papel da mesoderma e suas subestruturas na origem do TA tem base em trabalhos anteriores que ganharam mais robustez com evidências mais recentes que fizeram uso de análises metodológicas mais precisas graças ao avanço da tecnologia. Sebo e colaboradores (2018) por meio do rastreamento da linhagem de adipócitos, mostraram que células de adipócitos localizados na região dorso-axial, e uma grande proporção do tecido perigonodal (59,5%) (Figura 1), surgem do mesoderma somático, que também são precursores dos miócitos, reforçando achados anteriores que foram postuladas por Atit e colaboradores (ATIT *et al.*, 2006; SEBO *et al.*, 2018). Por outro lado, adipócitos localizados na região subcutânea, assim como os adipócitos encontrados na região visceral, parecem ser oriundos das placas laterais (CHAU *et al.*, 2014; SEBO *et al.*, 2018).

Figura 1 - Modelo de linhagem de adipócitos.



Fonte: Adaptado de Sebo e Rodeheffer (2019).

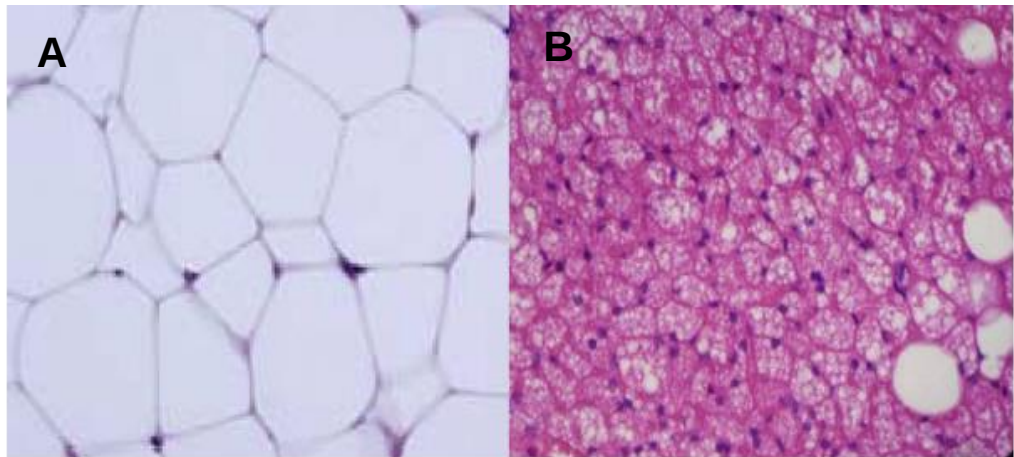
Embora grande parte dos adipócitos, localizados nos mais diversos depósitos corporais sejam originários da camada mesodérmica, Bilon e colaboradores (2007) através do mapeamento de linhagem celular identificaram que as células adiposas que constituem a glândula salivar de roedores surgem da crista neural que tem derivação na camada germinativa ectodérmica (BILON et. al., 2007, SIMÕES COSTA; BRONNER, 2015). Ainda é incerto se adipócitos localizados em outras regiões craniofacial são oriundos da crista neural ou se possuem derivação ectoderma, a diversidade de características entre adipócitos de diferentes depósitos pode ser explicada por sua origem embrionária.

### 2.2.2 Características morfológicas e funcionais.

O TA é composto por adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, nervos e células imunes, entretanto os adipócitos são as principais células do tecido (CINTI, 2002). Os adipócitos são subdivididos em dois grandes grupos e classificados como adipócitos brancos (AB) e adipócitos marrons (AM), podendo ser facilmente identificados a partir de suas características morfológicas (Figura 2) (CINTI, 2002). Na última década foi proposta uma terceira classificação, a partir da identificação adipócitos com características de AM, que seriam oriundos de

AB a partir de um processo de “escurecimento”, sendo esses denominados de adipócitos bege (GONG *et al.*, 2010).

Figura 2 - Histologia do tecido adiposo branco (A) e marrom (B)



Fonte: Ràfols (2014).

Os AB são geralmente células esféricas que medem aproximadamente 10 milímetros contendo uma grande gotícula de lipídio esférica (maximizando o volume e minimizando a ocupação do espaço) ocupando a maior parte da estrutura celular (aproximadamente 90% do citoplasma) empurrando o núcleo e um número reduzido de outras organelas contra a membrana plasmática (CINTI, 2005). Os AB são células especializadas no rápido armazenamento de ácidos graxos na forma de triglicerídeos no citoplasma (em momentos de abundância energética) e na liberação dos mesmos para outros tecidos (em momentos de escassez) conferindo a esses grupos de células a característica de serem altamente plásticos e dinâmicos (FRIEDMAN, 2009).

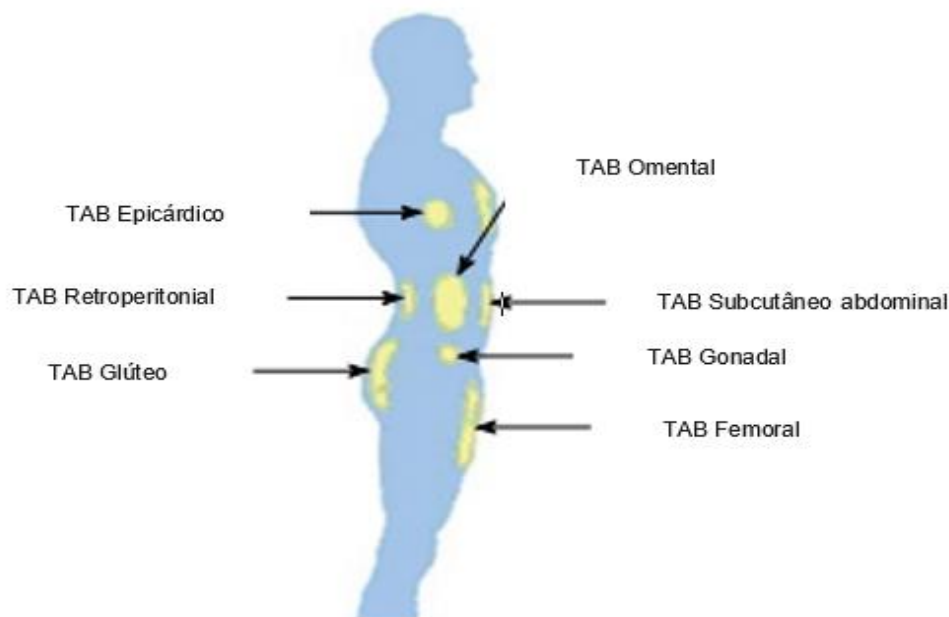
Por outro lado, os AM apresentam algumas diferenças significativas em relação aos adipócitos brancos, são células menores, seu citoplasma contém várias gotículas de lipídios, um núcleo arredondado e um considerável número de mitocôndrias, geralmente grandes e esféricas, e são caracterizados por sua forma tipicamente elipsoide (NECHAD; NICHOLLS, 1986). Essas mitocôndrias possuem característica particular e que vai definir a função celular, a presença da proteína desacopladora 1 (UCP), participante central da produção de calor, conferindo a característica termogênica da célula (CANNON; NEDERGAARD, 2004; RICQUIER, 2005).

O tecido adiposo branco (TAB) é o principal tipo de tecido adiposo encontrado em humanos adultos e é distribuído por todo o corpo em regiões subcutâneas, órgãos

viscerais e são nomeados de tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) e tecido adiposo branco visceral (TABv), respectivamente (IBRAHIM, 2010). O TABs está localizado sob a pele e em humanos está normalmente distribuído ao redor dos quadris, coxas e nádegas (Figura 3). Por sua vez, o TABv está localizado dentro da cavidade abdominal circundando órgãos internos (estômago, fígado, intestino e rins) e dependendo da localização pode ser subdividido em mesentérico, retroperitoneal, perigonadal e omental (Figura 3).

A característica funcional do tecido adiposo está estritamente relacionada às suas unidades funcionais, a célula adiposa (BERRY; RODEHEFFER, 2013). O TAB desempenha importante papel na captação, armazenamento e liberação de lipídios, atuando como órgão endócrino no qual os adipócitos secretam fatores humorais como as adipocinas (leptina, adiponectina, resistina, adipsina e visfatina), citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e proteína estimuladora de acilação (ASP) que possuem efeitos locais, periféricos e centrais, o que confere ao TA importante função na regulação de múltiplas funções orgânicas (MINER, 2004; RAJALA; SCHERER, 2003).

Figura 3 - Principais pontos de localização do TAB em humano adulto



Fonte: Adaptado de Park (2014).

Apesar de suas semelhanças histológicas, TABs e TABv possuem distinções celulares, anatômicas, metabólicas e fisiológicas que são específicas, e que estão

relacionadas com a região na qual estão localizados (GIRARD; LAFONTAN, 2008). O acúmulo subcutâneo de gordura funciona como um tampão fisiológico durante períodos de consumo excessivo de nutrientes, armazenando ácidos graxos livre na forma de triglicerídeos (FREEDLAND, 2004). Quando o TABs ultrapassa a capacidade de armazenamento a gordura começa a se acumular de forma anormal em outros locais como o TABv (BJÖRNTORP, 2001).

O acúmulo exacerbado de gorduras no TABv está associada à diminuição da tolerância a glicose, hiperglicemia, hiperinsulinemia sendo esses os principais fatores que colaboram para o surgimento de diabetes do tipo 2 (LEMIEUX; DESPRES, 1994; KEEFER; CAPUTO; TSEH, 2013). Indivíduos com obesidade visceral possuem grandes chances de desenvolver hipertensão arterial induzida por mecanismos intimamente relacionados a resistência à insulina (MCFARLANE *et al.*, 2001; SHARMA, ENGELI; PISCHON, 2001). Por essas razões, a adiposidade visceral representa um preditor de mortalidade independente da gordura corporal total (KOSTER *et al.*, 2015).

Alterações das características estruturais dos adipócitos é um fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina independente da adiposidade e suas respectivas localizações (WEYER *et al.*, 2000; LUNDGREN *et al.*, 2007; LÖNN *et al.*, 2010). Nos depósitos subcutâneos e viscerais, a hipertrofia está relacionada a hipertensão, sugerindo uma associação entre o tamanho dos adipócitos e o risco para doenças cardiometabólicas (LEDOUX *et al.*, 2010). Dados recentes mostram que alterações morfofuncionais nos adipócitos subcutâneos são possíveis responsáveis pelo acúmulo de lipídios visceral e ectópico (RAWSHANI *et al.*, 2020). Quanto ao conteúdo plasmático de lipídios, a hipertrofia dos adipócitos visceral pode causar aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), assim como na razão colesterol total/HDL (HOFFSTEDT *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Tecido adiposo como órgão endócrino e metabólico

A descoberta da leptina, um hormônio neuroendócrino e metabólico, secretado principalmente pelos adipócitos mudou a forma rudimentar pela qual era visto o tecido adiposo, hoje o mesmo é devidamente reconhecido como um importante órgão endócrino, capaz de secretar um grande número de compostos bioativos conhecidos como adipocinas (ZHANG *et al.*, 1994; BLÜHER; MANTZOROS, 2015). As adipocinas

são capazes de atuar em uma gama de tecidos como o cérebro, fígado, pâncreas, músculos e outros, tornando o tecido adiposo um órgão de intercomunicação capaz de coordenar e regular de forma sistêmica alguns processos fisiológicos como a resposta imune, inflamação, sensibilidade à insulina, metabolismo de glicose e lipídios, dentre outros processos (BLÜHER; MANTZOROS, 2015; FASSHAUER; BLÜHER, 2015; ADIYAMAN *et al.*, 2020).

Dentre os centenas de compostos bioativos produzidos pelo o tecido adiposo, os que possuem atividade no controle metabólico destacam-se, como possíveis alvos terapêuticos no combate às doenças metabólicas (LEHR; HARTWIG; SELL, 2012). Dentre as principais adipocinas destacam-se as que estão diretamente envolvidas no metabolismo energético como a leptina, adiponectina, DPP-4, resistina e vaspina (no metabolismo de glicose), a CD36, apelina e FGF-21 (no metabolismo de lipídios) (LAMERS *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013; BLÜHER, 2014; D'SOUZA *et al.*, 2017; QUINTANA-CASTRO *et al.*, 2020).

Alterações no metabolismo energético, principalmente a anormalidade na atividade mitocondrial do tecido adiposo podem ser considerada a gênese da disfunção tecidual, comprometendo todo o sistema orgânico (BÓDIS; RODEN, 2018). O metabolismo lipídico é altamente regulado no tecido adiposo, umas das principais funções do tecido adiposo é captar o excesso de ácidos graxos livres e armazená-los na forma de triglicerídeos em um processo lipogênico (síntese), bem como disponibilizar os ácidos graxos para outros tecidos em um processo de lipólise (hidrólise) (MCNAMARA, 1994).

A síntese de triglicerídeos nesse tecido ocorre a partir da glicose, através da enzima glicerol quinase. A glicose entra nos adipócitos usando os transportadores de glicose 1 e 4 (GLUT 1 e 4) sendo o GLUT 4 estimulado pela ação da insulina (LETO e SALTIEL, 2012). Na sequência, a glicose sofre ação de algumas enzimas como acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) até ser convertida em ácido graxo. Nos adipócitos, a lipólise dos triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol ocorre quando há uma necessidade energética (durante jejum ou treinamento físico intenso), e são lançados na circulação servindo como fonte de energia para tecidos metabolicamente ativos, como músculos, coração e cérebro, onde sua oxidação gera ATP (DUNCAN *et al.*, 2007).

Além de ser a maior fonte de combustível do corpo, o tecido adiposo também é reconhecido como um órgão dinâmico que atua em vários processos fisiológicos

importantes tais como, homeostase energética sistêmica e sensibilidade à insulina em todo o corpo (DE SÁ *et al.*, 2011). A descoberta da proteína desacopladora 1 (UCP1), gotículas lipídicas multiloculares e de um grande número de mitocôndrias, evidenciou que o BAT é um tecido metabolicamente ativo, com capacidade para aumentar o gasto energético sendo assim, um importante alvo terapêutico no combate as doenças associadas a disfunção do tecido adiposo (NEDERGAARD; CANNON, 2014). Dentre os mecanismos envolvidos na indução das características metabólicas no TAB, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) se destaca por estar diretamente associada ao processo de “escurecimento” do tecido adiposo branco, conferindo ao mesmo uma maior atividade metabólica (BIJLAND; MANCINI; SALT, 2013; KIM *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2018).

A AMPK atua diretamente no controle do Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1-alfa), uma proteína que regula a expressão de genes mitocondriais controlando a replicação do DNA mitocondrial e o metabolismo oxidativo celular (WAN *et al.*, 2014). A expressão do PGC1 alfa encontra-se em altos níveis nos tecidos onde mitocôndrias são abundantes e o metabolismo oxidativo é ativo como o TAM e o tecido musculoesquelético (PUIGSERVER *et al.*, 1998). Na literatura existe uma estreita associação entre a ativação de AMPK e a indução de PGC1-alfa em células adiposas, indicando que a AMPK atua diretamente no controle PGC1-alfa e consequentemente no controle de enzimas mitocondriais no TAB (GAIDHU *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011; GBURCIK; CLEASBY; TIMMONS, 2013).

Além disso a AMPK também controla a atividade do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR- $\gamma$ ), uma proteína altamente expressa no TA responsável por regular a adipogênese e a oxidação lipídica (GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014). O PPAR- $\gamma$  também está envolvido na regulação da sensibilidade à insulina através da estimulação da secreção de adipocitocinas, adiponectina e leptina nos adipócitos, que atuam como mediadores da ação da insulina em tecidos periféricos (BOTTA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019). Um passo fundamental na diferenciação e função dos adipócitos bege é mediado pela a AMPK, desencadeando uma série de eventos que poderiam culminar com o aumento da biogênese mitocondrial e oxidação (CANTÓ *et al.*, 2009; QIANG *et al.*, 2012). Desta forma a AMPK no tecido adiposo pode representar uma estratégia promissora para aumentar o gasto de energia e reduzir os níveis de glicose e lipídios circulantes, o que pode ser eficaz para o

tratamento de doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) e diabetes mellitus tipo 2 (DESJARDINS; STEINBERG, 2018).

### **2.3 Exercício físico**

O sedentarismo é um dos principais fatores de risco associadas ao surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas metabólicas como diabetes e cardiopatias, que por sua vez, representam as principais causas de mortalidade em todo o mundo (YOUNG et al., 2016; PATTERSON et al., 2018; EKELOUND et al., 2019). Apesar disto, as últimas estimativas globais mostraram que um a cada quatro adultos (27,5%) não alcançam os níveis anteriormente recomendados de atividade física pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (ao menos 150 min de atividade física moderada ou 75 min de atividade física vigorosa por semana, ou qualquer combinação dos dois) (ORGANIZATION, 2013; GUTHOLD et al., 2018).

Por outro lado, a prática regular de atividade física e exercício estão diretamente associados à diminuição na taxa de mortalidade por todas as causas. Em indivíduos fisicamente ativos existe uma menor propensão para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e diabetes tipo 2 a partir dos seus efeitos positivos sobre a sensibilidade à insulina, pressão arterial, biomarcadores lipídicos e sobre o controle de peso (SIGAL et al., 2007). Desta forma, a prática regular de atividade física e de exercícios físicos resultam em diversos benefícios para a saúde, assim, ser fisicamente ativo é a principal estratégia terapêutica não farmacológica no combate ao surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas, especialmente as doenças metabólicas e cardiovasculares (PEDERSEN; SALTIN; SPORTS, 2015; WARBURTON; BREDIN, 2017).

Os termos atividade física e exercício físico são por muitas vezes utilizados como sinônimos quando na verdade descrevem conceitos distintos. Atividade física é definida como qualquer movimento do corpo humano por meio da contração dos músculos esqueléticos que resultam em um aumento considerável das necessidades energéticas quando comparado ao gasto em repouso. Por outro lado, o termo exercício físico define um subgrupo da atividade física com movimentos corporais planejados, estruturados, que ao serem realizados de forma consistente melhoram ou mantêm um ou mais componentes da aptidão física (CASPERSEN; POWELL;

CHRISTENSON, 1985). A quantidade de atividade física está diretamente associada à melhora da saúde cardiovascular e ao risco reduzido de morbimortalidade, quando comparados com baixos níveis de atividade e/ou condicionamento físico, apresentando uma relação diretamente proporcional entre atividade física e saúde (BLAIR; CONNELLY; SPORT, 1996; HILLS; STREET; BYRNE, 2015).

O Colégio Americano de Medicina Esportiva recomenda que adultos estejam envolvidos em programas de treinamento cardiorrespiratório de intensidade moderada no mínimo 30 minutos por dia, durante 5 dias na semana resultando em um total de 150 minutos durante a semana, também é recomendado o treinamento cardiorrespiratório de intensidade vigorosa por no mínimo 20 minutos por dia em ao menos 3 dias da semana totalizando no mínimo 75 minutos por semana. Além disso é recomendado a realização de atividades que envolvam exercícios de resistência para cada um dos principais grupos musculares e exercícios neuromotores envolvendo equilíbrio, agilidade e coordenação, bem como exercícios de flexibilidade para a manutenção da amplitude do movimento (GARBER *et al.*, 2011).

A literatura tem mostrado uma associação inversa entre atividade física e os riscos no desenvolvimento de diabetes tipo 2, a partir dos efeitos da atividade física sobre a redução de adiposidade corporal, resultando em diminuição dos riscos à saúde relacionados à adiposidade (PAI *et al.*, 2012; AUNE *et al.*, 2015). No tecido adiposo o exercício físico aumenta a captação de glicose e melhora a sensibilidade a insulina no tecido adiposo através da regulação positiva de genes e proteínas envolvidos no metabolismo de glicose e captação de ácidos graxos (STEPHENSON *et al.*, 2013; LEHNIG *et al.*, 2019). Nesse sentido, o tecido adiposo é um órgão altamente responsivo ao exercício físico a partir das suas influências sobre marcadores metabólicos também em outros tecidos (STANFORD *et al.*, 2015).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar as implicações do treinamento físico moderado sobre o metabolismo energético do tecido adiposo branco de ratos juvenis submetidos à restrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Análise da morfologia dos adipócitos;
- Atividade de enzimas que regulam o metabolismo de carboidratos e lipídios como: fosfofrutoquinase (PFK), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), (FAS) e citrato sintase;
- Quantificação do RNAm dos genes AMPK, PPAR- $\gamma$  e PGC1- $\alpha$ ;
- Quantificação da expressão proteica de AMPK.

#### 4 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.

**Title:** Effects of protein malnutrition during the perinatal period on the development of adipose tissue in rats: a systematic review

**Authors:** Allifer Rosendo Pereira<sup>a,b</sup>, Renata Emmanuele Assunção Santos<sup>c</sup>, Mariana Pinheiro Fernandes<sup>a,b,c</sup>.

**Affiliations:**

<sup>a</sup> Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity graduate program in at the Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Nutrition graduate program, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

**Interest conflicts:** None.

**Author's address for correspondence:**

Mariana Pinheiro Fernandes. Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, R. Alto do Reservatório, S / n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE CEP 55608-680, Brasil. E-mail: mariana.fernandes@ufpe.br.

**Abstract**

Nutritional insults in early life, especially protein malnutrition, seem to be associated with morphological and functional changes in adipose tissue, which may influence the emergence and development of disorders that affect health. This review aims to assess the repercussions of perinatal maternal exposure to low-protein diets on morphological and functional characteristics of the offspring's adipose tissue. For this, two independent researchers carried out systematic search in the electronic databases Medline/PubMed (Online System for Research and Analysis of Medical Literature), CINAHAL (Cumulative Index for Nursing Literature Allied to Health), Web of Science, SCOPUS and EMBASE. In the search for articles, variations of the following

descriptors were used: "Protein-Energy Malnutrition", "protein deficiency", "gestation", "pregnancy", "lactation", "breast feeding", "adipocyte", "adipose tissue", "white adipose tissue". This review was designed according to the preferred reporting items for systematic analysis and meta-analysis. The systematic review protocol was submitted to the International Prospective Registry of Systematic Reviews. Eight articles were included in this review. The results of the studies suggest that maternal exposure to low-protein diets during pregnancy and/or lactation appears to modify offspring morphological characteristics that result in changes in the metabolic activity of adipocytes. Further studies are recommended for morphological and functional analyses of the metabolic activity of adipocytes.

**Key words:** Protein-energy malnutrition; pregnancy; lactation; white adipose tissue.

## 1 Introduction

In recent years there have been great advances in the understanding of the complex actions of adipose tissue (AT) in organic systems, with emphasis on its crucial role in energy homeostasis. Adipocytes, cells that make up adipose tissue, not only act as a reservoir for the storage and use of energy, but also act as sensors of energy status, secreting hormonal factors capable of regulating the activity of other tissues involved in metabolism. White adipose tissue (WAT) is a complex organ that plays an important role in energy control and homeostasis [1,2]. Thus, alterations in the biological activity of WAT may represent an ignition point in the emergence and development of metabolic disorders.

Among the main changes that potentiate WAT dysfunction and the emergence of metabolic disorders, the increase in the size (hypertrophy) of adipocytes is a determining factor for the development of various pathophysiological conditions, such as obesity and related diseases such as both type 2 diabetes mellitus (DM2) and cardiometabolic syndromes [3]. Hypertrophied adipocytes have lower metabolic activity and are independent markers of insulin resistance and DM2 [4]. In non-diabetic individuals, adipose cell hypertrophy is negatively correlated with insulin sensitivity at the cellular and systemic level in eutrophic individuals [5].

The nutritional environment in early life, especially protein malnutrition, seems to be associated with certain morphological and functional changes in adipose tissue, which may be a starting point in the emergence and development of disorders that affect health, given the importance of this tissue in the maintenance of physiological

activities [6, 7]. Even today, malnutrition, especially maternal and child malnutrition, represents a major problem for global health, especially in the current context of the COVID-19 pandemic, where small advances in the fight against protein malnutrition are strongly threatened [8]. Thus, this systematic review aims to evaluate the repercussions of perinatal maternal exposure to low-protein diets on morphological and functional characteristics of offspring adipose tissue.

## 2. Materials and methods

The present systematic review was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [9]. Our review was conducted using a protocol submitted to the International Prospective Registry for Systematic Reviews (PROSPERO) and published under registration number CRD42021243228.

### 2.1 Search strategy

The bibliographic research was carried out between May and July 2021, using the electronic databases Medline/PubMed (Online System for Research and Analysis of Medical Literature), CINAHAL (Cumulative Index for Nursing Literature Allied to Health), Web of Science, SCOPUS and EMBASE. Variations of the following descriptors were used: "Protein-Energy Malnutrition", "protein deficiency", "gestation", "pregnancy", "lactation", "breast feeding", "adipocyte", "adipose tissue", "white adipose tissue".

The bibliographic search in the electronic databases was performed by two independent reviewers (ROSENDO A and SANTOS REA), using a pre-established protocol. A third reviewer (FERNANDES MP) was consulted when necessary and acted as a mediator in decisions regarding the inclusion or exclusion criteria, when there was no agreement between the reviewers. Data extraction was performed according to the eligibility criteria established for the study.

### 2.2 Eligibility criteria

The population of interest was limited to rodents, including mice and rats of any sex and age, who were pups of mothers exposed to a low-protein diet during pregnancy and lactation. There were no year or language limitations for the inclusion of articles. Articles that did not meet the eligibility criteria for the population, intervention, comparison, and results were excluded.

### 2.3 Data extraction

Two independent researchers, according to the eligibility criteria, performed

data extraction after a complete reading of previously selected articles. A third researcher was consulted when there was some kind of disagreement between the two researchers. The main data collected were: animal species, diet composition, intervention period, post-weaning diet, analyzed parameters and main offspring results, which were transcribed in a table (Table 1).

#### 2.4. Risk of bias assessment

The assessment of the methodological quality of the studies included in the systematic review was performed using the SYRCLE risk of bias (RoB) tool, which consists of 10 questions related to random sequence generation, baseline characteristics, allocation concealment, housing randomization, investigator blinding of the treatment each animal received during the experiment, random selection of animals for outcome evaluation, evaluator blinding, incomplete outcome data, selective reporting, and other biases [10]. The reviewers applied the tool individually on the included articles, independently. Each of the questions was judged to have a high, uncertain, or low risk of bias. After this phase, the Kappa test was applied to measure the level of agreement between reviewers. The information from this step was synthesized through a figure and used to prepare the study flowchart (Figure 1).

### 3. Results

During the first search step in the electronic databases (Medline/PubMed, CINAHAL, Web of Science, SCOPUS and EMBASE) a total of 921 articles were found. Subsequently, 525 duplicates were removed, leaving a total of 396 articles for analysis of title and abstracts, from which 342 were excluded for not meeting the eligibility criteria (Table 1) in the title and abstract. A total of 54 articles were read, of which 48 were excluded after applying the exclusion criteria, leaving a total of 8 articles included in this review (Table 1). All articles found were published in English. The stages of carrying out the research are described in the flowchart shown in Figure 1.

#### 3.1 Evaluation of the quality of articles

The RoB assessment applied between the reviewers resulted in a Kappa = 0.85, classified as an almost perfect level of agreement [11] (Figure 2). In the analysis of the risk of bias, we observed that all studies presented some type of methodological error. Regarding the baseline characteristics, five articles reported the baseline characteristics of their subjects [12-15,19]. None of the articles presented records on allocation concealment. Only Xie et al. (2017) presented information on the procedures for allocating animals into groups. No article presented records on the blinding of the

researchers responsible for data collection. No article was clear about randomization in housing or selection of animals for extracting results. Finally, all articles presented study reports.

### 3.2 Methodological profile of the study

All studies used male rodents of the following species: Wistar (n=5) [12,13,15,18,19], Swiss mouse (n=1) [14], ICR mouse (non-isogenic) (n=1) [17] and Sprague-Dawley (n=1) [16]. The nutritional manipulation performed in all articles was with isocaloric diets, offered during the gestation and lactation periods, with the exception of the work by Bringhenti et al. (2011), where the diet was offered in the last seven days of gestation. The diets were isocaloric, with the control diet (C) containing a protein percentage of approximately 20% and the low-protein diet (LP) ranging between 10% and 4%. Only the groups composed of control and hypoproteic offspring were analyzed. All articles presented results on the morphometry of white adipose tissue (cite) and three presented results of molecular analyses related to the metabolism of adipose tissue [12,13,15].

### 3.3 Main results

The main results related to morphological characteristics were described according to the parameters analyzed in the studies (Table 2). Morphometric analyses were the most cited, and showed some variations in the results reported in the articles. Of the eight articles selected, four did not point to statistical differences on the morphometric parameters of adipocytes [12,16,17,19]. On the other hand, Bringhenti et al. (2011), and De Oliveira et al. (2016), demonstrated an increase in the cell diameter of adipocytes. Shepherd et al. (1997) also reported an increase in cell diameter and, additionally, a decrease in the amount of fat cells per deposit [13,14,18]. Finally, Martin-Gronert et al (2016) showed a reduction in the adipocyte area of the hypoproteic animals [15].

Additionally, three articles presented in their studies, results of molecular analyses, registering the expression and content of proteins as related to the metabolic activity of the cell. Guan et al. (2005) found an increase in the expression of genes related to transport (GLUT-4) and glucose degradation (Glucose-6-phosphate isomerase, phosphofructokinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), as well as genes related to lipid metabolism (acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase). Martin-Gronet et al. (2016) demonstrated in their results a decrease in the content of proteins involved in insulin signaling (insulin receptor substrate 1/IRS-1,

phosphoinositide 3-kinase/PI3K), while Shepherd et al. (1997) demonstrated in their article a two-fold increase in insulin receptor levels.

#### 4. Discussion

Adipocyte size has been found to be correlated with tissue metabolic characteristics such as insulin resistance [20, 21]. As morphological changes accompany changes in adipose function, morphometric analyses of adipose tissue can be considered an important tool for understanding how adipose tissue mass can change in response to factors such as maternal protein restriction in the early periods of life and how this can influence residual and systemic health [22]. Therefore, a detailed understanding of these mechanisms can produce strategies to combat the associated alterations in metabolic pathologies.

The main results included in this systematic review included an identification of the characteristics in morphometric patterns and in some components such as enzymes and markers acting on the metabolic activity of adipocytes from offspring of mothers fed a low-protein diet (4%-10%) during pregnancy periods. and/or lactation. Thus, this systematic review sought to provide information on how maternal protein restriction in critical periods of development can affect the morphological characteristics and impair the functional activities of adipocytes, the functional units of adipose tissue.

Despite some variations among them, the results of three studies included here, which proposed to carry out an analysis of morphological characteristics and of some functional components involved in the activity of carbohydrate and lipid metabolism, showed at least one change in one of the two parameters investigated. [12,13,15]. The results of the studies that were limited to investigating morphological alterations were ambiguous: two of them showed an increase in cell diameter [14,18] and another three showed that there were no differences in this parameter [16,17,19]. These results could be more conclusive if functional analyses had been performed.

Morphological changes were the most common results found among the studies reviewed. Hypertrophied adipocytes [13,14,15] are normally associated with impaired cellular function and are considered metabolically inefficient cells related to pathological conditions [20,21]. Small fat cells can also be dysfunctional, due to a direct relationship that exists between small adipocytes and impaired expansion capacity as well as a link to insulin resistance [22,23]. Changes in the cellular morphological pattern are mechanisms that can explain tissue dysfunction, so they represent an

important object of study on the contribution of adipose tissue to the emergence and development of chronic diseases [24].

Three studies included in this review [12,13,15] evaluated components involved in carbohydrate and lipid metabolism of adipocytes of animals descended from mothers who received a low-protein diet. The study by Guan et al. (2005) reported an increase in metabolic activity, especially of lipogenic enzymes, as did the study by Shepherd et al. (1997) on an increase in insulin receptor levels. Analyzed together, these studies seem to show a compensatory mechanism that works to increase energy stores in response to the nutritional insult suffered by these animals in early life. A decrease in the expression of proteins related to insulin signaling reported by Martin-Gronert et al. (2016), seems to be a consequence of the small number of adipocytes presented in this study

## 5. Conclusion

Maternal exposure to low-protein diets during pregnancy and/or lactation seems to modify, in some of the models described here, the morphological characteristics that result in changes in the metabolic activity of adipocytes in the offspring. Studies that were limited only to morphological analyses were inconclusive and the results are not sufficient to describe the effects of protein malnutrition in early life and its repercussions on adipose tissue. Clearly, more precise information is necessary, requiring a morphological analysis followed by a functional analysis of the metabolic activity of adipocytes.

## References

- [1] Scherer PE. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006; 55, 1537–1545.
- [2] Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* 2015; 208, 501–512.
- [3] Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, and Tchernof A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015; 52, 301-313.
- [4] Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, and Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*. 2007; 50, 625-633.

- [5] Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, and Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*. 2000; 43, 1498-1506.
- [6] Lakshmy R. Metabolic syndrome: role of maternal undernutrition and fetal programming. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2013; 14:229-240.
- [7] Xita N, Tsatsoulis A. Fetal origins of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1205, 148-155.
- [8] Victora, Cesar G. et al. Revisiting maternal and child undernutrition in low-income and middle-income countries: variable progress towards an unfinished agenda. *The Lancet*. 2021; 397, 1388-1399..
- [9] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *J Clin Epidemiol*. 2009; 62, 1006–12
- [10] Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014; 14, 1–9.
- [11] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1997; 33, 159-174.
- [12] Guan H, et al. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2005; 288, 663-673.
- [13] Shepherd PR, et al. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *British Journal of Nutrition*. 1997; 78, 121-129.
- [14] Bringhenti I, et al. An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011; 22, 1009-1014.
- [15] Martin-gronert MS, et al. Cell-autonomous programming of rat adipose tissue insulin signalling proteins by maternal nutrition. *Diabetologia*. 2016; 59, 1266-1275.
- [16] Xie L, et al. Effects of prenatal low protein and postnatal high fat diets on visceral adipose tissue macrophage phenotypes and IL-6 expression in Sprague Dawley rat offspring. *PLoS One*. 2017; 12, 69-81.
- [17] Kim J, Choi A, Kwon, Young Hye. Maternal protein restriction altered insulin resistance and inflammation-associated gene expression in adipose tissue of young adult mouse offspring in response to a high-fat diet. *Nutrients*. 2020; 12, 1103.

- [18] De Oliveira JC et al. Protein restriction during the last third of pregnancy malprograms the neuroendocrine axes to induce metabolic syndrome in adult male rat offspring. *Endocrinology*. 2016; 157, 1799-1812.
- [19] Bieswal F, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity*. 2006; 14, 1330-1343.
- [20] De Souza CJ. et al. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2001; 8, 1863-1871.
- [21] Lundgren, M et al. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*. 2007; 3, 625-633.
- [22] Berry, R, et al. Imaging of adipose tissue. *Methods in enzymology*. 2014; 537, 47-73.
- [23] Bernstein RS, Grant N, and Kipnis DM. Hyperinsulinemia and enlarged adipocytes in patients with endogenous hyperlipoproteinemia without obesity or diabetes mellitus. *Diabetes*. 1975; 24, 207-213.
- [24] Bjorntorp P, Grimby G, Sanne H, Sjostrom L, Tibblin G, and Wilhelmsen L. Adipose tissue fat cell size in relation to metabolism in weight-stable, physically active men. *Horm Metab Res*. 1972; 4, 182-186.
- [25] Fang L, Guo F, Zhou L, Stahl R, and Grams J. The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte*. 2015; 4, 273-279.
- [26] McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, Reaven GM, and Cushman SW. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia*. 2007; 50, 1707-1715.
- [27] Stenkula KG, Erlanson-Albertsson C. Adipose cell size: importance in health and disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2018; 315, 284-295.

Table 1. Eligibility criteria applied in the study.

|                        | Inclusion criteria                                                                                                                    | Exclusion Criteria                            |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Population             | Adult murine model animals, including mice and rats, male or female                                                                   | Genetically modified animals                  |
| Intervention           | Maternal exposure (pregnancy and/or lactation) to low-protein diets (maximum 10%)                                                     | Studies that did not offer an isocaloric diet |
| Comparison             | Maternal exposure to control diet (approximately 20% protein)                                                                         | None                                          |
| Results                | Primary results: morphometric analysis of adipose tissue.<br>Secondary results: analysis of the metabolic activity of adipose tissue. | None                                          |
| Publication parameters | There was no restriction of articles by date or language.                                                                             | In vitro studies                              |

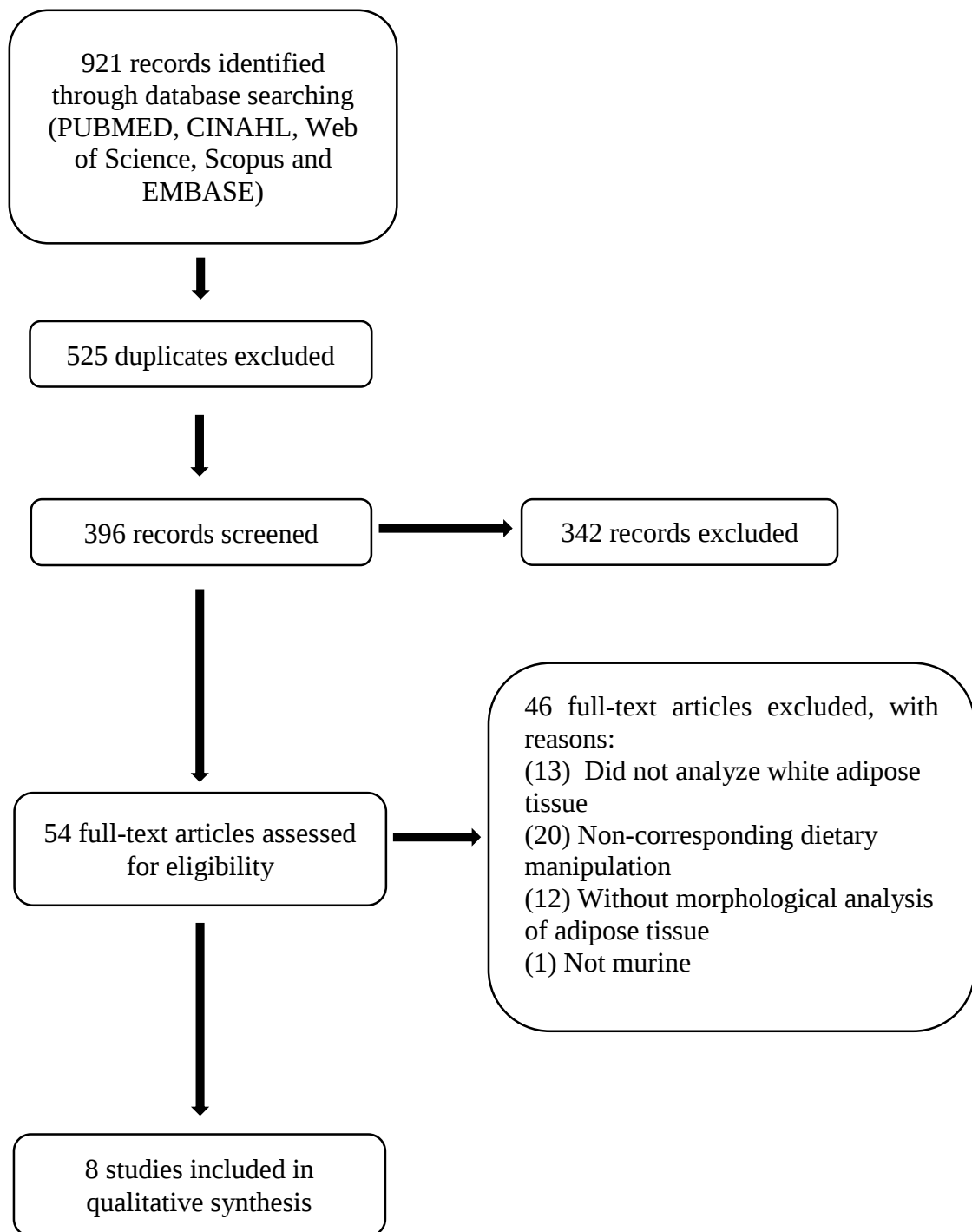


Figure 1. Flowchart of the study selection process

|                             | Random sequence generation (selection bias) | Baseline characteristics (selection bias) | Allocation concealment (selection bias) | Random housing (performance bias) | Blinding of participants and personnel (performance bias) | Random outcome data (attrition bias) | Blinding of outcome assessment (detection bias) | Incomplete outcome data (attrition bias) | Selective reporting (reporting bias) | Other bias |
|-----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| Bieswal et al., 2006        | ?                                           | +                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Bringhenti et al., 2011     | ?                                           | +                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| De Oliveira et al., 2016    | ?                                           | ?                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Guan et al., 2005           | ?                                           | +                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Kim et al., 2020            | ?                                           | ?                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Martin-gronert et al., 2016 | ?                                           | +                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Shepherd et al., 1997       | ?                                           | +                                         | -                                       | ?                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |
| Xie et al., 2017            | ?                                           | ?                                         | -                                       | +                                 | -                                                         | ?                                    | +                                               | ?                                        | +                                    | +          |

Figure 2. Risk of bias (RoB) summary of studies: review authors judgments about each RoB item for each included article.  low RoB,  high RoB,  unclear RoB.

| Author<br>(year)                       | Species/Sex                      | Diet<br>composition                        | Intervention<br>period      | Post-<br>weaning<br>diet | Experimental<br>Age | Parameters<br>analyzed in<br>the offspring                         | Main results in offspring                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Bieswal <i>et al.</i>, 2006</b>     | Wistar/<br>Males                 | C (20%<br>protein)<br>LP (8%<br>protein)   | Gestation/<br>Lactation     | 16%<br>protein           | 294 days            | 1. Cell<br>morphometry                                             | 1. There was no difference between<br>the groups                                                                                                                              |
| <b>Bringhenti <i>et al.</i>, 2011</b>  | Camundon-<br>gos Swiss/<br>Males | C (20%<br>protein)<br>LP (8%<br>protein)   | Gestation/<br>Lactation     | Control                  | 120 days            | 1. Cell<br>morphometry                                             | 1. Adipocytes were 17% higher in<br>the LP group (p<0.05)                                                                                                                     |
| <b>De Oliveira <i>et al.</i>, 2016</b> | Wistar/<br>Males                 | C (20,5%<br>protein)<br>LP (4%<br>protein) | Last 7 days<br>of pregnancy | Control                  | 91 days             | 1. Cell<br>morphometry                                             | 1. The adipocytes of the<br>malnourished group were higher<br>when compared to the control<br>group:<br>- Retroperitoneal (↑179%)<br>- Epididymal (↑67%)<br>- Inguinal (↑78%) |
| <b>Guan <i>et al.</i>, 2005</b>        | Wistar/<br>Males                 | C (20%<br>protein)<br>LP (8%<br>protein)   | Gestation/<br>Lactation     | Control                  | 130 days            | 1. Cell<br>morphometry<br><br>2. Gene<br>expression<br>analysis by | 1. There was no difference between<br>the groups<br><br>2. Expression of genes associated<br>with metabolism in the LP group:<br>Glucose                                      |

|                                    |                            |                                     |                         |         |          |                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                    |                            |                                     |                         |         |          | RT / PCR<br>(genes associated with carbohydrate and lipid metabolism)                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑GLUT-4 (1.6 X)</li> <li>- ↑ Glucose-6-phosphate isomerase (1.6 X)</li> <li>- ↑PFK-1 (1.5 X)</li> <li>- ↑G3PDH (1.9 X)</li> <li>- ↑ Malic enzyme (1.8 X)</li> <li>- ↑ Malate dehydrogenase (1.6 - X)</li> </ul> Lipids <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑FAS (3.3 X)</li> <li>- ↑ACC (1,7 X)</li> <li>- ↑SCD (2.6 X)</li> </ul> |
| <b>Kim et al., 2020</b>            | Camundon-gos-ICR/<br>Males | C (20% protein)<br>LP (10% protein) | Gestation/<br>Lactation | Control | 175 days | 1. Cell morphometry                                                                                                                          | 1. There was no difference between the groups                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Martin-Gronert et al., 2016</b> | Wistar/<br>Males           | C (20% protein)<br>LP (8% protein)  | Gestation/<br>Lactation | Control | 420 days | 1. Cell morphometry<br><br>2. Gene expression analysis by RT / PCR (genes associated with insulin signaling)<br><br>3. Protein detection via | 1. The median area of adipocytes was smaller in the LP group (p<0.001)<br><br>2. There was no difference between the groups<br><br>3. Protein expression (p<0.05): <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓IRS1</li> <li>- ↓PI3k <i>p110β</i></li> <li>- ↓Akt1</li> <li>- ↓pAkt -Ser473</li> <li>- ↓PKCζ</li> </ul>                                                            |

|                              |                                 |                                    |                         |         |         |                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              |                                 |                                    |                         |         |         | <i>western blotting</i>                                                     | -Glut4: There was no difference<br>-Akt2: There was no difference<br>-PI3K p85 $\alpha$ : There was no difference                                                                                                                                                                    |
| <b>Shepherd et al., 1997</b> | <i>Wistar/</i><br>Males         | C (20% protein)<br>LP (8% protein) | Gestation/<br>Lactation | Control | 42 days | 1. Cell morphometry<br><br>2. Protein detection via <i>western blotting</i> | 1. In the LP descendent group, fat depots were significantly higher (p< 0.0001), a reduction in the number of fat cells per depot was also observed (p< 0.05)<br><br>2. Protein expression:<br>- $\uparrow$ Níveis do receptor de insulina (2 X)<br>- Glut4: There was no difference |
| <b>Xie et al., 2017</b>      | <i>Sprague-Dawley/</i><br>Males | C (20% protein)<br>LP (8% protein) | Gestation/<br>Lactation | Control | 84 days | 1. Cell morphometry                                                         | 1. There was no difference between the groups                                                                                                                                                                                                                                        |

## **5 ARTIGO**

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **BRITISH JOURNAL OF NUTRITION**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO

### **EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE O METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS JUVENIS APÓS RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

#### **Autores:**

Allifer Rosendo Pereira<sup>1, 3</sup>; Anderson Apolonio Silva Pedroza<sup>1, 4</sup>; Elenilson M. Bernardo<sup>1, 4</sup>; Severina Cassia Andrade Silva<sup>1, 5</sup>; Cláudia Jacques Lagranha<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>; Mariana Pinheiro Fernandes<sup>1, 2, 3</sup>

#### **Afiliações:**

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício,

<sup>2</sup>Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte, Universidade Federal de Pernambuco-CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, Universidade Federal de Pernambuco-CAV Federal, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

<sup>4</sup>Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>5</sup>Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

**Conflitos de interesse:** nenhum

#### **Endereço do autor para correspondência:**

Mariana Pinheiro Fernandes. Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, R. Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE. CEP 55608-680, Brasil. E-mail: mariana.fernandes@ufpe.br.

## Resumo

O ambiente nutricional é importante para a saúde em diferentes fases da vida, sobretudo nos períodos iniciais afetando o desenvolvimento alguns tecidos, como o adiposo. O tecido adiposo é um órgão metabolicamente dinâmico e ativo e o comprometimento de suas funções fisiológicas tem correlação com condições patológicas. O exercício físico moderado é um modulador positivo do metabolismo, sendo uma estratégia para combater o surgimento e/ou progressão de doenças crônicas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar as implicações do treinamento físico moderado sobre o metabolismo do tecido adiposo branco de ratos submetidos a restrição proteica durante períodos críticos do desenvolvimento. Inicialmente, ratas *wistar* receberam dietas com níveis normais de proteína (controle-C, 17%) e baixo teor de proteína (hipoprotéica-HP, 8%), na gestação e lactação. Após o desmame, todos os grupos receberam dieta C até a eutanásia, aos 60 dias. Aos 30 dias, os animais dos grupos CT e HT foram submetidos a um programa de treinamento físico (60 min/dia, 5 dias/semana, durante 4 semanas). Os resultados indicam que restrição proteica no início da vida altera a estrutura morfológica dos adipócitos, o metabolismo oxidativo e a expressão de genes metabólicos. Em contraste, o programa de exercício físico regulou a adipogênese, o metabolismo oxidativo e a expressão genica e proteica da AMPK, atenuando os efeitos deletérios da restrição proteica no metabolismo energético. Assim, nossos achados sugerem que o exercício físico moderado pode ser uma importante ferramenta contra os efeitos deletérios de uma dieta restrita em proteínas no início da vida sobre o metabolismo energético.

**Palavras-chave:** Desnutrição proteica; gestação; lactação; exercício; tecido adiposo branco.

## **Introdução**

As características fisiológicas de um sistema orgânico começam a ser modeladas ainda na concepção e podem ser definidas a partir de influências do ambiente no qual estão inseridos [1]. De fato, o consumo nutricional é um fator determinante para a saúde em diversos períodos da vida, porém a alimentação em períodos iniciais do desenvolvimento tem um importante papel nas condições de saúde a médio e longo prazo [2,3]. A teoria da “origem desenvolvimentista da saúde e da doença” propõe que no início da vida condições adversas como o aporte nutricional inadequado pode contribuir para o surgimento de alguns fatores de risco relacionados à síndrome metabólica, como resistência à insulina, dislipidemia aterogênica e obesidade abdominal podendo resultar em diversos prejuízos para a saúde [4,5].

Utilizando modelo de restrição de proteína em ratos, foi observada uma redução na expressão de proteínas chaves que regulam a interação insulina-receptor no tecido adiposo e de outros genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos [6, 7], além disso, alguns autores identificaram alterações morfológicas nos adipócitos que podem comprometer suas características funcionais [6, 8]. Esses resultados indicam que a restrição proteica no início da vida pode alterar as características morfológicas e funcionais do tecido adiposo, o que poderia explicar o papel do mesmo no surgimento e desenvolvimento de distúrbios metabólicos que afetam a saúde [9].

Em contraste, a prática regular de exercícios físicos resultam em diversos benefícios para a saúde, e por isso é considerado o principal agente terapêutico não farmacológico no combate ao surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas, especialmente as doenças metabólicas [10, 11]. No tecido adiposo, o exercício físico aumenta a captação de glicose e melhora a sensibilidade à insulina através da

regulação positiva de genes e proteínas envolvidos no metabolismo de glicose e captação de ácidos graxos [12, 13]. Nesse sentido, o tecido adiposo é um órgão responsivo ao exercício físico e parece exercer influência sobre marcadores metabólicos também em outros tecidos [14].

Os efeitos do exercício físico sobre o metabolismo energético no tecido adiposo em modelos de restrição proteica no início da vida são desconhecidos. Com isso, hipotetizamos que um programa de exercício físico moderado pode atenuar os prejuízos da restrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento sobre o metabolismo do tecido adiposo branco a partir da análise de componentes enzimáticos chaves do metabolismo de glicose e lipídeos, bem como de sinalizadores moleculares que atuam na regulação do metabolismo energético.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e desenho experimental**

A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA após a aprovação do projeto junto ao Comitê de Ética em Estudos com Animais do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (nº do protocolo: 0060/2018). Ratas virgens da linhagem *Wistar* (n=8) pesando entre 210-250g foram alojadas individualmente em biotério de experimentação com temperatura de 22°C±2, ciclo claro-escuro de 12/12 horas no Centro Acadêmico de Vitoria-UFPE. Quando em período estral, foram postas para acasalar na proporção 2 fêmeas para 1 macho, e a prenhez foi diagnosticada através da identificação de espermatozoides nas lâminas do esfregaço vaginal [16].

As progenitoras foram randomizadas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e hipoproteica (HP, caseína a 8%) [17]. As ratas foram mantidas em suas respectivas dietas ao longo da gestação e lactação.

Quarenta e oito horas após o parto, as ninhadas foram ajustadas aleatoriamente para oito filhotes igualmente distribuídos para machos (n=4) e fêmeas (n=4). Aos vinte e um dias de vida, todos os animais foram desmamados e passaram a receber dieta de biotério (Labina; Purina Agriband, Brasil). Aos trinta dias de vida, a prole foi subdividida em dois grupos de acordo com a predisposição dos animais a um treinamento físico moderado em esteira ergométrica como previamente estabelecido [18]. Ao final, 4 grupos foram formados: controle não treinado (CNT), controle treinado (CT), hipoproteico não treinado (HPNT) e hipoproteico treinado (HPT).

### **Treinamento físico em esteira**

O programa de treinamento físico moderado, em esteira ergométrica para ratos, seguiu um protocolo experimental previamente publicado que consiste em 4 semanas de treino, por 5 dias/semana e 60 min/dia (5 min aquecimento, 0,3-0,4 km/h; 50 min da velocidade principal, 50% de sua capacidade máxima de corrida; e 5 min de volta a calma, 0,3-0,4 km/h), a 50% da capacidade máxima de corrida [18]. Os ratos foram testados no 6º dia de cada semana de treino para que a velocidade fosse ajustada, a fim de que todos os animais corressem a 50% da capacidade máxima de corrida durante o período de treinamento. O grupo não treinado permaneceu nas gaiolas, durante o mesmo tempo e ambiente dos animais em treinamento.

### **Preparação da Amostra para Histologia**

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercícios, todos os ratos foram guilhotinados e submetidos à cirurgia para a remoção do material biológico. O tecido adiposo epididimal foi removido e fixado com formalina tamponada neutra a 10% (NBF), a 4°C, durante 24 horas e posteriormente armazenados em álcool 70%. Após a lavagem, as amostras de tecido foram desidratadas progressivamente em álcool graduado antes de submetê-las à diaforização do xilol. O tecido foi cortado a uma

espessura de quatro microns e fixado em lâminas de microscópio de vidro, seguido de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram examinadas usando microscopia óptica convencional (Nikon Eclipse E200, São Paulo, Brasil) e as imagens foram capturadas por uma câmera (Moticam 3000, Kowloon Bay, Hong Kong) e analisadas usando o Image J Pro e o software de computador 1.44 (Research Services Branch, Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, Bethesda, MD, EUA) [8].

### **Preparação do tecido adiposo para utilização nas técnicas bioquímicas**

Parte do tecido adiposo foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM, Nonidet 1%). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1.180 g, a 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises foi submetido a quantificação proteica.

### **Dosagem de proteína**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD et al. (1976) [19]. O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/mL) foi utilizada como padrão.

### **Determinação da atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK-1)**

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método descrito por Opie & Newsholme (1967) [20]. O sistema de reação consiste de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1.0 mM, mercaptoetanol 5 mM, NADH<sup>+</sup> 13 mM, ATP 20mM, AMP 10 mM, aldolase 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 5 mM e triose-fosfato isomerase 5mM, ao qual foi adicionada a amostra, (0.10 mg de proteína) em um

volume final de 0,2 mL. O ensaio teve início após a adição do substrato (frutose-6-fosfato 1mM) e para determinar a atividade enzimática foram realizadas 20 leituras a cada 4 segundos, a uma temperatura de 30°C, a 340 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/min/mg proteína.

#### **Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase**

A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por Bergmeyer et al. (1972) [20]. O sistema de reação enzimático foi composto por Tris-HCl 86 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,9 mM, NADPH + 0,4 mM, glicose-6-fosfato 1,2 mM, Triton X-100 0,05 % (v/v), pH 7,6. Na sequência foi adicionado ao sistema de reação, 0,10mg de proteína total e o ensaio teve início logo após a adição do substrato (glicose-6-fosfato). A determinação da atividade enzimática foi feita a 30°C, durante 4 min, em um comprimento de onda de 340 nm em um volume final de 0,2mL, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/min/mg proteína.

#### **Avaliação da atividade da ácido graxo sintase**

A atividade da ácido graxo sintase foi avaliada seguindo a diminuição na absorbância a 340 nm resultante da oxidação de NADPH dependente da adição de malonil-CoA. Cada reação continha 0,10 mg de proteína, 0,1 M de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,025 mM de acetil-CoA, 0,18 mM de NADPH, 3 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 24 mg de albumina, mantidos a 30°C. A reação foi iniciada pela adição do substrato da enzima [21] e a leitura foi feita em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/min/mg proteína.

#### **Avaliação da atividade do citrato sintase**

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp, a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio [22]. O tampão de ensaio contém Tris-aminometano 50 mM (pH 8,1), EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,1 mM, oxaloacetato 0,5 mM, Triton X-100 0,05% (v/v) e 0,10 mg de proteína. A reação teve início pela adição de oxaloacetato ao meio, a atividade enzimática foi avaliada em 14 leituras por amostra, cada leitura teve um tempo de leitura de 4 segundos a uma temperatura de 30°C, a 412 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos como mmol/min/mg proteína.

#### **Determinação da expressão dos genes pela metodologia de “Real Time-PCR”**

O RNA total foi obtido do tecido adiposo epididimal dos 4 grupos experimentais pelo método de extração com isotiocianato de guanidina usando o reagente Trizol e água isenta de RNase. A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise da pureza do RNA, o valor da absorbância obtido a 260 nm foi dividido pelo obtido a 280 nm e a amostra que apresentou a razão 260/280 igual ou superior a 1.6 foi utilizada (indicativo de alto grau de pureza). O RNA obtido foi armazenado a -20°C. A expressão dos genes foi quantificada por PCR em tempo real, utilizando o reagente SYBR Green como marcador fluorescente. As reações foram realizadas em 25 µl de uma mistura contendo RNA da amostra, sequência de primers (sense e anti sense), água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato, isenta de RNase) e mix SYBR Green platinum (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBER Green I) (Invitrogen, California, EUA). A avaliação foi realizada por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [23], utilizando o gene  $\beta$ -actina como controle interno (normalizador) para normalização de expressão

gênica.

Tabela 1: Sequência de *Primers* para cada gene

| Gene           | Forward primer (5'- 3') | Reverse primer (5'- 3') |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| AMPK           | ACCATTTAACTCGGCCTCAC    | TTGCTCTACACACTTCTGCC    |
| PPAR- $\gamma$ | CAGAGAAAGCCACCAGGAAG    | ACAGCTCAGGTGGGGTATTG    |
| PGC1- $\alpha$ | AACAGCAAAAGCCACAAAGA    | AAGTTGTTGGTTTGGCTTGA    |
| B2M            | TGACCGTGATCTTTCTGGTG    | ACTTGAATTTGGGGAGTTTTCTG |

### Quantificação da expressão proteica de AMPK

Para análise da expressão proteica de AMPK, as amostras de tecido adiposo epididimal foram submetidas à quantificação proteica pelo método de Bradford [18]. Western Blotting foi realizado como descrito por Towbin [25]. Utilizamos como anticorpo primário o AMPK $\alpha$ ,  $\beta$  e anticorpo secundário IgG anti-coelho da Santa Cruz (Santa Cruz *Biotechnology*, Portland, Oregon, U.S).

### Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente utilizamos o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA Two-way, tendo como fatores o ambiente nutricional e o exercício físico. Para o post-hoc test foi utilizado o teste de Tukey, considerando significativo o valor de  $p < 0,05$ .

### Resultados

#### Efeito do treinamento físico moderado sobre o metabolismo oxidativo

A fim de confirmar os efeitos do protocolo de treinamento físico moderado utilizado em nosso estudo sobre o metabolismo oxidativo avaliamos a atividade da citrato sintase (CS) nos músculos soleo e EDL. O treinamento utilizado aumentou

significativamente a atividade da enzima CS em 42% no grupo controle (CNT=21,6±1,4 mmol/min/mg prot. vs CT=33,7±2,1 mmol/min/mg prot.,  $p<0,0001$ ) e em 35% no grupo submetido a restrição proteica materna (HPNT=14,2±1,7 mmol/min/mg prot. vs HPT=24,4±1,6 mmol/min/mg prot.,  $p<0,0001$ ) (Figura 1 A).

No músculo EDL, o protocolo de treinamento utilizado também aumentou a atividade da CS, observamos aumento significativo de 44,4% da atividade enzimática no grupo controle (CNT=0,05±0,005 mmol/min/mg prot. vs CT=0,09±0,008 mmol/min/mg prot.,  $p<0,0001$ ) e 57% no grupo de restrição proteica (HPNT=0,03±0,004 mmol/min/mg prot. vs HPT=0,07±0,01 mmol/min/mg prot.,  $p<0,0001$ ) (Figura 1 B).

### **Aspectos morfológicos dos adipócitos e do tecido adiposo**

Em relação a análise histológica do tecido adiposo epididimal, as diferenças entre a área dos adipócitos está representada graficamente na figura 2 e mostra que a restrição proteica durante os períodos iniciais da vida reduziu em 27,7% a área média dos adipócitos em comparação com o grupo controle ( $p<0,0001$ ). Observamos também que o protocolo de treinamento aplicado não foi capaz de reverter tal efeito (Figura 2 A).

Avaliamos também a quantidade de adipócitos por área e identificamos que tal parâmetro aumentou em 45% nos animais que sofreram restrição proteica materna durante os períodos iniciais da vida quando comparado com o controle ( $p<0,0001$ ). Nos animais submetidos ao programa de exercício físico encontramos resultados distintos, no grupo controle treinado encontramos um aumento significativo de 12% em comparação com o grupo controle não treinado ( $p<0,01$ ), já nos animais do grupo de restrição proteica, o programa de treinamento não foi capaz de promover mudanças significativas (Figura 2 B).

## **Efeito do treinamento físico moderado sobre a atividade de enzimas chaves no controle do metabolismo energético do tecido adiposo epididimal**

Ao avaliarmos a atividade da PFK-1 não encontramos diferença significativa entre os grupos controle e hipoproteico (CNT=0,026±0,004 mmol/min/mg prot. vs HPNT=0,018±0,003 mmol/min/mg prot.,  $p=0,53$ ). Ao avaliarmos os grupos que participaram do programa de treinamento observamos um aumento de 31,5% na atividade enzimática da PFK-1 quando comparamos os grupos controle (CNT=0,026±0,004 mmol/min/mg prot. vs CT=0,038±0,007 mmol/min/mg prot.,  $p<0,001$ ) por outro lado, não observamos diferenças significativas ao compararmos os grupos que sofreram restrição proteica materna (HPNT=0,018±0,003 mmol/min/mg prot., vs HPT=0,024±0,002 mmol/min/mg prot.) (Figura 3A).

Não encontramos diferenças significativas na atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) entre os grupos (CNT= 0,0043± 0,0030 mmol/min/mg prot. vs HPNT= 0,0027±0,0021 mmol/min/mg proteína,  $p<0,001$ ; CT= 0,0051±0,0018 mmol/min/mg proteína vs HPT= 0,0027±0,0010 mmol/min/mg proteína; HPNT= 0,0027±0,0021 mmol/min/mg proteína vs HPT= 0,0027±0,0010 mmol/min/mg proteína (Figura 3B).

Ao avaliarmos a FAS observamos uma redução de 67% na atividade enzimática do grupo hipoproteico em comparação com o grupo controle (CNT= 4,3±1,27 mmol/min/mg proteína vs HPNT= 1,4±0,26 mmol/min/mg proteína,  $p<0,0001$ ). Ao compararmos a atividade enzimática nos animais hipoproteicos treinados e não treinados não observamos diferença entre os grupos (HPNT= 1,4±0,26 mmol/min/mg proteína vs HPT=0,6±0,3 mmol/min/mg proteína), em contra partida, ao avaliarmos os animais do grupo controle identificamos uma redução de 72% da atividade enzimática nos animais treinados (CNT= 4,3±1,27 mmol/min/mg

proteína vs CT=1,2±0,03 mmol/min/mg proteína,  $p<0,0001$ ) (Figura 3C).

A avaliação da atividade da enzima CS também foi realizada no tecido adiposo epididimal e os resultados demonstraram que a restrição proteica materna reduziu aproximadamente 55% a atividade enzimática (CNT=45,6±2,41 mmol/min/mg proteína vs HPNT=20,5±1,47  $\mu$ mol/min/mg proteína,  $p<0,01$ ) (Figura 3). Por outro lado, o treinamento físico reverteu os prejuízos da restrição proteica na atividade da CS, e isso ficou evidenciado ao observarmos um aumento de 5,2 vezes na atividade enzimática (HPNT=20,5±1,47 mmol/min/mg proteína vs HPT= 106,6±12,65 mmol/min/mg proteína,  $p<0,0001$ ) (Figura 3D).

### **Regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo energético do tecido adiposo epididimal e expressão proteica de AMPK**

A partir da observação dos nossos resultados, identificamos que a dieta materna pobre em proteínas aumentou em 94% a atividade da expressão do gene AMPK (CNT=1±0.64 vs HPNT=17.22,5±3.50,  $p<0.05$ ) (Figura 4A). Ao analisarmos o efeito do programa de treinamento sobre a expressão do AMPK identificamos um aumento em 98% (CNT=1±0,64 vs CT= 91.65±3,92,  $p<0,0001$ ). Ainda sobre os efeitos do programa de treinamento sobre a expressão do gene AMPK identificamos um aumento de 68% nos animais do grupo hipo treinados quando comparados com o grupo hipoproteico não treinado (HPNT=17.22±3.50 vs HPT=54.49±4.50,  $p<0,0001$ ) (Figura 4 A).

Também avaliamos a expressão da proteína AMPK e observamos uma redução em 55% nos animais que sofreram restrição proteica materna (CNT=530399.8±13672.0 vs HPNT=236250.8±4177,  $p<0,0001$ ). Ao avaliarmos os animais submetidos ao programa de treinamento identificamos uma redução de 51%

na expressão da proteína AMPK nos animais normonutridos (CNT=530399.8±13672.0 vs CT=326197.5±15564.0,  $p<0,0001$ ) (Figura 4B).

Também investigamos os efeitos da restrição proteica perinatal e do programa de treinamento físico sobre a expressão do gene PPAR $\gamma$ , observamos que a restrição proteica aumentou em 98% a expressão do gene quando comparado com o grupo controle (CNT=1±0.49 vs HPNT=64.38±3.23,  $p<0,0001$ ). Ao observarmos o efeito do programa de treinamento nos animais controle identificamos um aumento de 94% na expressão do gene (CNT=1±0.49 vs CT=19.21±1.8,  $p<0,0001$ ), resultados que não se estenderam ao grupo hipoproteico onde observamos uma diminuição de 85% na expressão do gene (HPNT=64.38±3.23 vs HPT=9.47,  $p<0,0001$ ) (Figura 4C).

Outro gene que teve a sua expressão avaliada em resposta a restrição nutricional e ao programa de treinamento físico foi o PGC1-alfa. Nossos resultados apontam que a restrição proteica nos períodos iniciais da vida aumentou 94% a expressão desse gene em comparação com o grupo controle (CNT=1±0.78 vs HPNT=19.67±2.37,  $p<0,0001$ ). No que se refere ao programa de treinamento não observamos diferença significativa quando comparamos os animais normonutridos (CNT=1±0.78 vs CT=3.03±,  $p>0,05$ ), porém esses resultados foram diferentes quando observamos os efeitos do programa de treinamento no grupo hipoproteico, onde houve um aumento de 53% na expressão do gene (HPNT=19.67±2.37 vs HPT=42.11±3.20,  $p<0,0001$ ) (Figura 4D).

## **Discussão**

Dados epidemiológicos e experimentais indicam que uma série de distúrbios metabólicos podem derivar de eventos que ocorrem durante períodos considerados críticos para o desenvolvimento, tais como gestação, lactação e primeira infância [26].

O conceito da origem desenvolvimentista da saúde e da doença afirma que um ambiente adverso como a desnutrição nos períodos iniciais da vida pode comprometer o desenvolvimento de vários tecidos, incluindo o tecido adiposo, alterando funções bioquímicas e fisiológicas, gerando disfunção do equilíbrio energético contribuindo para o surgimento de doenças metabólicas na vida adulta [27, 28]. Os dados aqui apresentados demonstram que a restrição proteica altera a morfologia dos adipócitos, bem como a expressão de genes e proteínas associadas a atividade de enzimas chaves que atuam no metabolismo energético. Além disso, nosso trabalho demonstra evidências de que um protocolo de treinamento físico moderado é capaz de atenuar efeitos deletérios causados pela restrição proteica na atividade metabólica do adipócito.

As primeiras fases da vida são períodos extremamente sensíveis a fatores nutricionais e hormonais, que modulam a multiplicação e diferenciação de precursores celulares de adipócitos [29]. O presente estudo indica que características morfológicas dos adipócitos da prole são sensíveis à restrição proteica materna, uma vez que a restrição proteica durante a gestação e lactação resultou em adipócitos atrofiados na prole, tal como foi encontrado em estudos com modelo experimental semelhante ao nosso [30, 31]. A atrofia dos adipócitos compromete sua função de armazenar lipídios, contribuindo para um desequilíbrio metabólico, além de aumentar os riscos de acúmulo ectópico de lipídios em outros tecidos, como fígado e musculoesquelético [8]. Nossos resultados reforçam evidências de trabalhos anteriores que indicam alterações morfológicas nos adipócitos em função da restrição proteica em períodos iniciais da vida, que por sua vez podem aumentar o risco de complicações metabólicas.

Em relação aos aspectos morfológicos do tecido adiposo, os resultados

apontam que a restrição proteica provocou um aumento na quantidade de adipócitos. Esses resultados corroboram com outros que também identificaram em modelo experimental com ratos, um aumento na taxa de proliferação de pré-adipócitos, que reflete no aumento da quantidade de adipócitos por área [8]. Em relação ao treinamento físico utilizado, o mesmo não surtiu efeito sobre nenhum aspecto morfológico aqui destacado, provavelmente pelo fato de que a quantidade de adipócitos é determinada principalmente nos períodos iniciais da vida tornando-se estável, logo, as características estruturais do tecido foram estabelecidas antes da aplicação do protocolo de treinamento utilizado [32, 33].

O aumento na quantidade de adipócitos é um processo adipogênico altamente regulado por fatores de transcrição como o receptor ativado por proliferador de peroxissomos  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [34]. Encontramos um aumento significativo na expressão genica do PPAR $\gamma$  nos animais que sofreram restrição proteica, o que pode explicar o aumento na quantidade de adipócitos por área analisada, tendo em vista a participação do mesmo no processo de proliferação celular. Condizente com nossos resultados, também foi observado um aumento na expressão do PPAR $\gamma$  [35] em modelo experimental de restrição proteica semelhante ao nosso. Ao observarmos os efeitos do programa de treinamento, nossos resultados são conflitantes, no grupo NCT encontramos um aumento da expressão do gene, demonstrando que esse programa de treinamento aumentou a expressão do PPAR $\gamma$  em indivíduos normo nutridos como também foi observado por outros pesquisadores [36], no entanto, o programa de exercício moderado nos animais HPT reduziu a expressão genica do PPAR $\gamma$  nos animais de restrição proteica.

No que refere-se ao metabolismo energético, o protocolo de exercício físico utilizado em nosso trabalho teve efeito positivo no metabolismo oxidativo, visualizado

a partir do aumento da atividade enzimática da citrato e diminuição da atividade da FAS no tecido adiposo epididimal. A redução de aproximadamente 55% na atividade da citrato sintase no tecido adiposo, em virtude da restrição proteica representa uma condição fisiológica semelhante a de indivíduos pré-diabéticos, um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 [37]. Em contrapartida, o protocolo de exercício físico aumentou em 5x a atividade da enzima no tecido adiposo, melhorando o metabolismo oxidativo indicando uma maior contribuição do tecido no gasto energético melhorando assim, o equilíbrio metabólico. Esses resultados são semelhantes a outros que verificaram a efetividade de diferentes protocolos de treinamento físico sobre metabolismo energético do tecido adiposo [38, 39, 40].

O tecido adiposo é um órgão chave no controle metabólico e uma de suas principais funções é armazenar o combustível excedente [41]. Nesse processo, a enzima ácido graxo sintase possui um papel fundamental sintetizando palmitato que servirá como precursor para a síntese de outros ácidos graxos [42]. Em nossos resultados identificamos uma redução de 67% na atividade da ácido graxo sintase em decorrência da restrição proteica, indicando um comprometimento da atividade básica do adipócito que é estocar combustível excedente. Essa falha no armazenamento pode causar elevação de ácidos graxos circulantes, que podem acumular-se em tecidos não adiposos resultando num efeito prejudicial em múltiplos órgãos e sistemas [43]. Nos animais controle o programa de exercício diminuiu a atividade da ácido graxo sintase. Esses dados estão de acordo com os resultados de Askew e colaboradores, que justificou tais adaptações no metabolismo energético como um mecanismo adaptativo para manter os níveis circulantes de substrato energético para serem utilizados pelo músculo esquelético durante o exercício, e aumentando a síntese de glicogênio [44].

Identificamos também que o protocolo de exercício físico aumentou a atividade da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) nos animais controle treinados mas não nos animais hipoproteicos, independente do treinamento. A PFK-1 é uma importante enzima que atua no catabolismo de glicose. O metabolismo da glicose contribui com apenas 10% do seu produto final para síntese de ácidos graxos no tecido adiposo de ratos [45, 46]. Assim, o aumento na atividade da PFK-1 está relacionado com uma maior contribuição de glicose para o metabolismo oxidativo em função do treinamento físico, que foi discutido anteriormente a partir dos resultados da citrato sintase. A ação da insulina é uma das principais vias que regulam o metabolismo da glicose em adipócitos, e o exercício atua de forma significativa na sinalização da insulina no tecido adiposo [47], o que pode explicar nossos resultados observados no grupo controle treinado, no grupo hipoproteico não treinado encontramos uma redução ao compararmos com o grupo normo não treinado, nesse contexto a redução na atividade da PFK pode ter relação com uma possível redução na sensibilidade a insulina, o principal mediador do metabolismo de carboidratos, fenômeno esse que foi observado em modelo de trabalho semelhante ao nosso anteriormente citado [6]. Também avaliamos a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), uma importante enzima que atua numa via de fornecimento de substratos, além de liberar NADPH que pode ser utilizado na síntese de ácidos graxos [48]. Nem a restrição proteica, nem o exercício físico alteraram a atividade dessa enzima no tecido adiposo epididimal, o que indica que não houve comprometimento na oferta de NADPH em função da variação nutricional sofrida no início da vida.

Ainda em relação a avaliação da expressão de genes envolvidos no metabolismo energético do tecido adiposo, os resultados apresentados indicam que a expressão gênica do coativador 1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de

peroxissoma (PGC1 $\alpha$ ) está aumentada nos animais que sofreram restrição proteica, nos animais treinados e não treinados. O PGC-1 $\alpha$  é um regulador transcricional importante na remodelação e biogênese mitocondrial promovendo o aumento na atividade metabólica do tecido adiposo [49]. Nossos resultados não indicam uma associação direta entre o aumento na atividade metabólica do tecido adiposo dos animais hipoproteicos em função da maior expressão do PGC-1 $\alpha$ , uma vez que a atividade do metabolismo oxidativo do mesmo mostrou-se reduzida nesses animais, como visto nos resultados da citrato sintase. Entretanto, esse aumento na expressão de PGC-1 $\alpha$  nos animais hipoproteicos pode estar associado a maior expressão da AMPK no tecido adiposo epididimal, como uma forma de adaptação metabólica desses animais, em resposta a diminuição do metabolismo oxidativo causada pela restrição proteica materna [50]. Além disso, avaliando os efeitos do treinamento físico utilizado em nosso estudo nos animais hipoproteicos, observamos um efeito adicional do exercício físico na expressão de PGC-1 $\alpha$ , indicando que o mesmo foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do insulto nutricional sobre o metabolismo oxidativo do tecido adiposo.

Também foi visto que a restrição proteica por si aumentou a expressão genica da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no tecido adiposo, e que o protocolo de exercício físico utilizado potencializou a expressão da AMPK tanto no grupo controle quanto no grupo hipoproteico. A literatura tem demonstrado que a AMPK no tecido adiposo aumenta a oxidação de ácidos graxos, diminui a síntese de lipídios e limita a lipólise no interior dos adipócitos, uma vez que um aumento não regulado na degradação de triglicerídeos poderia resultar numa maior disponibilidade de ácidos graxos livres, que seriam convertidos em acil-CoA e isso demandaria um gasto energético considerável, para os adipócitos, além de acarretar um aumento nos níveis

de AMP, o que dificultaria o restabelecimento do déficit energético pela ação da AMPK. Além disso, o aumento acentuado na expressão de AMPK no tecido adiposo em função do exercício diminui a secreção de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6, como já demonstrado na literatura, proporcionando uma resposta anti-inflamatória nesse tecido que poderia refletir numa melhora metabólica [51, 52, 53].

Entretanto, os resultados de expressão genica não foram condizentes com os resultados de expressão proteica, onde foi observada uma diminuição nos níveis da proteína AMPK tanto em função da restrição proteica durante períodos iniciais do desenvolvimento quanto em função do exercício físico, ambos de forma isolada. Sabe-se que a AMPK é um sensor central de energia, além de desempenhar um papel primordial no metabolismo lipídico, especialmente na regulação do gasto energético do tecido adiposo marrom/bege e no escurecimento do tecido adiposo branco [54]. Kopietz e colaboradores [55] demonstraram que a insulina inibe a atividade da AMPK no tecido adiposo de ratos. Em nossos resultados, a restrição proteica reduziu os níveis de AMPK, o que reforça nossa hipótese de que o tecido adiposo epididimal dos animais hipoproteicos são menos sensíveis a atividade da insulina, o que também poderia estar relacionado a redução do metabolismo oxidativo nos adipócitos dos animais que sofreram restrição proteica.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o treinamento físico moderado em esteira foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da restrição proteica no metabolismo energético do tecido adiposo a partir de ajustes moleculares que refletiram numa maior atividade metabólica tecidual. Acreditamos que outros estudos devem ser realizados na tentativa de identificar a participação de outras moléculas que atuam no metabolismo energético do tecido adiposo, em resposta a alteração do ambiente nutricional, e que estejam envolvidas na ação da insulina e atividade mitocondrial.

## Agradecimentos

A aquisição dos materiais utilizados neste trabalho foi financiada pela Fundação de Amparo à Ciência e Pesquisa de Pernambuco Estado (FACEPE), além do fornecimento da bolsa de estudo para ARP.

## Referências

- [1] Power C *et al.* (2007) Life-course influences on health in British adults: effects of socio-economic position in childhood and adulthood. *International journal of epidemiology* **36**, 532-539.
- [2] Burdge GC, Lillycrop KA (2014) Environment-physiology, diet quality and energy balance: the influence of early life nutrition on future energy balance. *Physiology & behavior* **134**,119-122.
- [3] Lao L, Zhang L, Du L. (2015) Malnutrition in early life and cardiovascular disease in adulthood. *Journal of Zhejiang University (Medical Science)* **44**, 349-353.
- [4] Gluckman PD, Hanson MA, Mitchell MD. (2010) Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome medicine* **2**, 1-3.
- [5] Bateson P *et al.* (2004) Developmental plasticity and human health. *Nature* **430**, 419-421.
- [6] Martin-Gronert MS *et al.* (2016) Cell-autonomous programming of rat adipose tissue insulin signalling proteins by maternal nutrition. *Diabetologia* 2016; **59**,1266-1275.
- [7] Guan H *et al.* (2005) Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **288**, E663-E673.
- [8] Ferland-mccollough D *et al.* (2012) Programming of adipose tissue miR-483-3p and

GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell Death & Differentiation* **19**, 1003-1012.

[9] Xita N Tsatsoulis A. (2010) Fetal origins of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1205**, 148-155.

[10] Pedersen BK, Saltin B. (2015) Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **2**, 1-72.

[11] Warburton DER, Bredin SSD. (2017) Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. *Current opinion in cardiology* **32**, 541-556.

[12] Stephenson EJ *et al.* (2013) Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low-or high-endurance running capacity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E429-E438.

[13] Lehnig AC *et al.* (2019) Exercise training induces depot-specific adaptations to white and brown adipose tissue. *IScience* **11**, 425-439.

[14] Stanford KI *et al.* (2015) A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes* **64**, 2002-2014.

[15] Boström P *et al.* (2012) A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468.

[16] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology* **62**, 609-614.

[17] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR, George C. (1993) 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* **123**,

1939-1951.

[18] Pedroza AAS *et al.* (2021) Moderate offspring exercise offsets the harmful effects of maternal protein deprivation on mitochondrial function and oxidative balance by modulating sirtuins. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **31**, 1622-1634.

[19] Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.

[20] Opie LH, Newsholme EA. (1967) The activities of fructose 1, 6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochemical Journal* **103**, 391-399.

[21] Bergmeyer HU. (1972) Standardization of enzyme assays. *Clinical chemistry* **18**, 1305-1311.

[22] Goodridge AG. (1972) Regulation of the activity of acetyl coenzyme A carboxylase by palmitoyl coenzyme A and citrate. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 6946-6952.

[23] Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. (1976) Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal* **154**, 689-700.

[24] Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402-408.

[25] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences* **76**, 4350-4354.

[26] Ravelli AC *et al.* (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* **70**, 811-816.

- [27] Barker DJ. (2004) The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 26-33.
- [28] Lukaszewski MA, Eberle D, Vieau D, Breton C. (2013) Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E1195-E1207.
- [29] Ailhaud G, Guesnet P. (2004) Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obes Rev* **5**, 21–26.
- [30] Tsujikawa M, Kimura S. (1980) Effect of early feeding on cellularity of rat adipose tissue. *J Nutr Sci Vitaminol* **26**, 475– 82.
- [31] Bieswal F, Ahn M, Reusens B *et al.* (2006) The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 1330–1343.
- [32] Spalding KL *et al.* (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453** 783–787.
- [33] Hirsch J, Han PW. (1969) Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J. Lipid Res* **10**, 77–82.
- [34] Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. (2009) Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function—of mice and men. *Genes* 2009 **23**, 788-797.
- [35] Guan H, Arany E, van Beek JP *et al.*. (2005) Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005**8**, E663-E667.
- [36] Kawamura T, Yoshida K, Sugawara A *et al.* (2004) Regulation of skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by exercise and angiotensin-

converting enzyme inhibition in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens Res* **27**, 61-70.

[37] Szczerbinski L *et al.* (2021) The Response of Mitochondrial Respiration and Quantity in Skeletal Muscle and Adipose Tissue to Exercise in Humans with Prediabetes. *Cells* **10**, 3013.

[38] Stephenson EJ *et al.* (2013) Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low-or high-endurance running capacity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305** E429-E438..

[39] HIGA TS *et al.* (2014) Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. *Life sciences* **03**, 41-48.

[40] Carobbio S, Pellegrinel V, Vidal-Puig A. (2017) Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Obesity and lipotoxicity* **960** 161-196.

[41] Swierczyński J, Sledziński T. (2012) Metabolic and regulatory function of fatty acid synthase. *Postepy biochemii* **58**, 175-185.

[42] Engin AB. What is lipotoxicity?. (2017) *Obesity and lipotoxicity* **960**, -197-220.

[43] Askew EW *et al.* (1975) Response of lipogenesis and fatty acid synthetase to physical training and exhaustive exercise in rats. *Lipids* **10**, 491-496.

[44] Getty-Kaushik L *et al.* (2010) Mice Deficient in Phosphofructokinase-M Have Greatly Decreased Fat Stores. *Obesity* **18**, 434-440.

[45] Botion LM *et al.* (1998) Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism* **47**, 1217-1221.

[46] Klepac K *et al.* (2019) The role of brown and beige adipose tissue in glycaemic

control. *Molecular aspects of medicine* **68**, 90-100.

[47] Carvalho SD, Negrao N, Bianco AC. (1993) Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **6**, E874-E881.

[48] Wu Z *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98:115-124.

[49] Daval M, Foufelle F, Ferré P. (2006) Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *The Journal of physiology* **574**, 55-62.

[50] Cantó C, Auwerx J. (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* **2**, 98-105.

[51] Sivasinprasasn S *et al.* (2015) Obese-insulin resistance accelerates and aggravates cardiometabolic disorders and cardiac mitochondrial dysfunction in estrogen-deprived female rats. *American aging association* **37**, 1-11.

[52] Wang Q *et al.* (2018) AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin. Biological & pharmaceutical bulletin* **41**, 985-993.

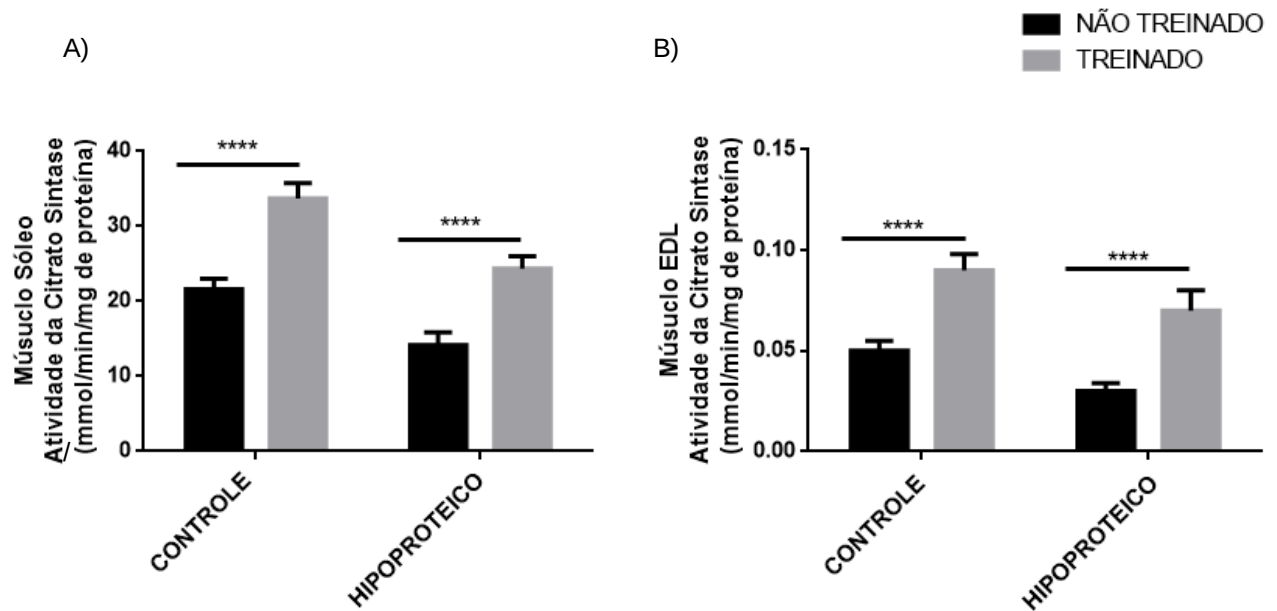
[53] Hardie DG. (2016) Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharmaceutica Sinica* , **6**, 1-19.

[54] Wang Q *et al.* (2021) The New Role of AMP-Activated Protein Kinase in Regulating Fat Metabolism and Energy Expenditure in Adipose Tissue. *Biomolecules* **11**, 1757.

[55] Kopietz F *et al.* (2020) Inhibition of AMPK activity in response to insulin in adipocytes: involvement of AMPK pS485, PDEs, and cellular energy levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **11**, E459-E471.

## Figuras

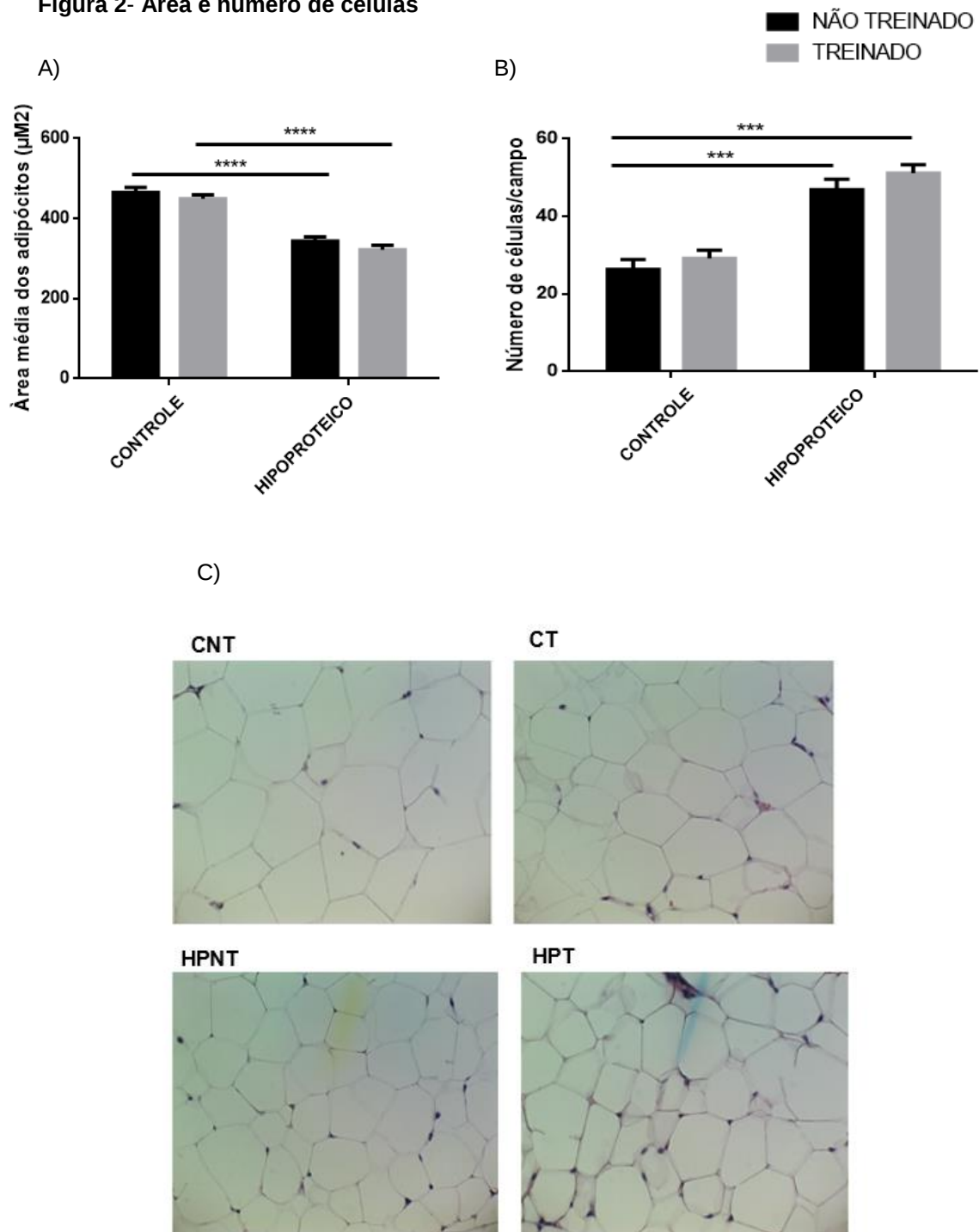
Figura 1- Atividade da citrato sintase nos músculos sóleo e EDL



Efeito da restrição proteica e treinamento físico moderado na atividade da enzima citrato sintase na prole: A) músculo sóleo e B) músculo EDL. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

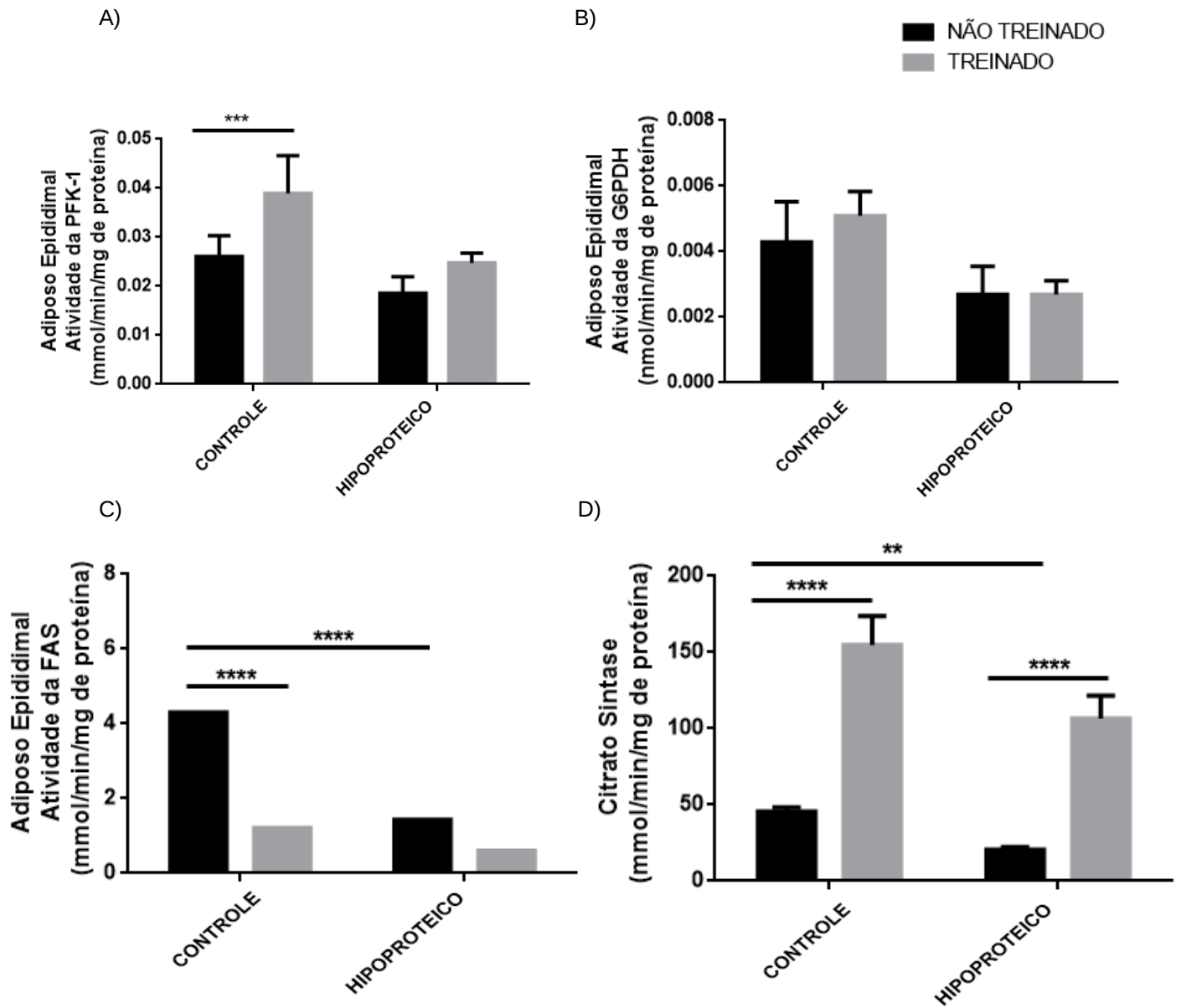
\*\*\*\*p<0,0001; n=6 por grupo.

**Figura 2- Área e número de células**



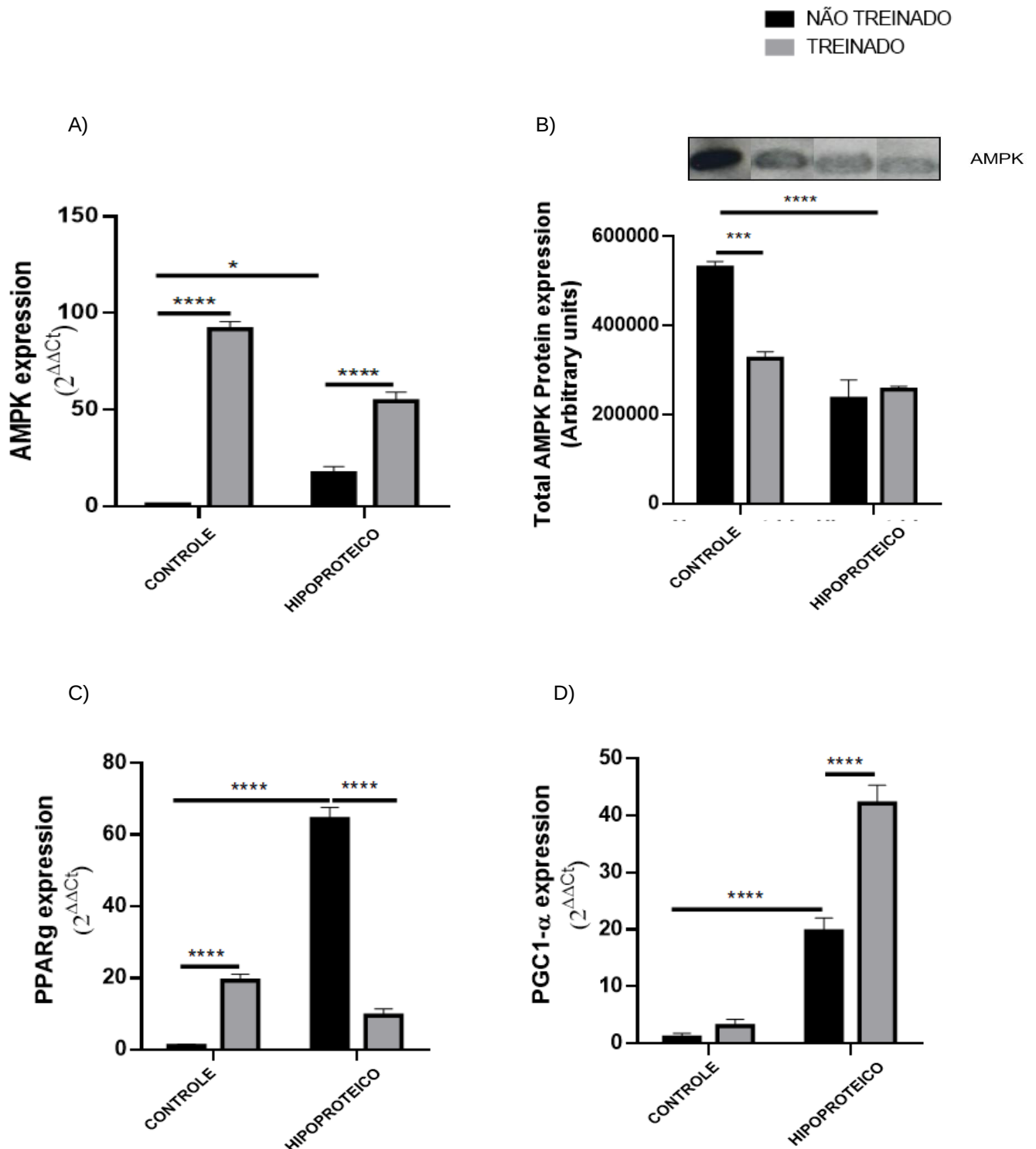
Características morfológicas dos adipócitos, área média dos adipócitos (A) e percentual de adipócitos por campo (B), (C) Imagens histológicas de WAT mostrando tamanho reduzido de adipócitos na prole de restrição proteica. Os dados foram analisados por microscopia de luz×400, e as barras representam a média ± desvio padrão da média. \*\*\*\*p<0,0001, n=4 animais por grupo.

Figura 3- Atividade de enzima s metabólicas no tecido adiposo epididimal



Efeito da restrição proteica e treinamento físico moderado na atividade das enzimas PFK (A), G6PDH (B), FAS (C) e citrato sintase (D) no tecido adiposo epididimal. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 6$  animais por grupo.

Figura 4- Expressão genica e expressão proteica



Efeito da restrição proteica e treinamento físico moderado sobre a expressão genica (A) e proteica (B) de AMPK e expressão genica de PPAR $\gamma$  (C) e PGC1 $\alpha$  (D). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 3-5$  animais por grupo.

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos dados aqui apresentados sugerimos que o treinamento físico moderado, é capaz de atenuar alguns parâmetros associados ao metabolismo energético, com destaque para modulação positiva do metabolismo oxidativo observado no tecido adiposo epididimal de ratos jovens submetidos a restrição proteica materna. Observamos também que a restrição proteica prejudica características morfológicas do tecido adiposo, o que explica o envolvimento da mesma no comprometimento tecidual e sua possível associação com doenças crônicas associadas ao tecido adiposo branco. Assim, concluímos que o exercício físico pode ser considerado uma interessante ferramenta no tratamento não farmacológico para prevenir ou até mesmo tratar possíveis doenças crônicas associadas a disfunção do tecido adiposo.

## REFERÊNCIAS

- ADIYAMAN, S. C., *et al.* The role of adiponectin in maintaining metabolic homeostasis. **Current Diabetes Reviews**, Emirados Árabes Unidos, v. 16, n. 2, p. 95-103, fev. 2020.
- ATIT, R., *et al.*  $\beta$ -catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. **Developmental biology**, Texas, v. 296, n. 1, p. 164-176, ago. 2006.
- AUNE, D., *et al.* Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose–response meta-analysis. **European journal of epidemiology**, California, v. 30, p. 529-542, 2015, jun. 2015.
- BARBOSA, V. A., *et al.* Exercise training plays cardioprotection through the oxidative stress reduction in obese rats submitted to myocardial infarction. **International journal of cardiology**, Amsterdã v. 157, n. 3, p. 422-424, abr. 2012.
- BARKER, D. J. Fetal programming of coronary heart disease. **Trends Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 13, n. 9, p. 364-8, nov 2002.
- BARKER, D. J., *et al.* Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetology**, Berlim, v. 36, n. 1, p. 62-67, jun. 1993.
- BARKER, D. J., OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, Londres, v. 1, n. 8489, p. 1077-1081, mai. 1986.
- BATESON, P., *et al.* Developmental plasticity and human health. **Nature**, Londres, v. 430, n. 6998, p. 419-421, jul. 2004.
- BIJLAND, S., MANCINI, S. J., SALT, I. P. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. **Clinical science**, Londres, v. 124, n. 8, p. 491-507, jul. 2013.
- BJÖRNTORP, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **Obesity reviews**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 73-86, jul. 2001.
- BLAIR, S. N., CONNELLY, J. C. How much physical activity should we do? The case for moderate amounts and intensities of physical activity. **Research quartely for exercise and sport**, Whashington DC, v. 67, n. 2, p. 193-205, mar. 1996.
- BLÜHER, M., MANTZOROS, C. S. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. **Metabolism, Filadélfia**, v. 64, n. 1, p. 131-145, jan. 2015.
- BLÜHER, M. Adipokines—removing road blocks to obesity and diabetes therapy. **Molecular metabolism**, Munique, v. 3, n. 3, p. 230-240, jun. 2014.

BÓDIS, K., RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **European journal of clinical investigation**, Berlim v. 48, n. 11, p. e13017, ago. 2018.

BOSTRÖM, P., *et al.* A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, Londres, v. 481, n. 7382, p. 463-468, jan. 2012.

BULL, F. C., *et al.* World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. **British journal of sports medicine**, Londres v. 54, n. 24, p. 1451-1462, dez. 2020.

CANNON, B., NEDERGAARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, Whashington DC, v. 84, n. 1, p. 277-359, jan. 2004.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. J. P. H. R. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports**, Whashington DC v. 100, n. 2, p. 126-131, mar. 1985.

CHAU, Y. Y., *et al.* Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. **Nature cell biology**, Londres, v. 16, n. 4, p. 367-375, mar. 2014.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, Nova York, v. 73, n. 1, p. 9-15, out. 2005.

CINTI, S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. **Endocrinological investigation**, Milão v. 25, n. 10, p. 823-835, nov. 2002.

D'SOUZA, A. M., *et al.* The glucoregulatory actions of leptin. **Molecular metabolism**, Munique, v. 6, n. 9, p. 1052-1065, set. 2017.

DAVIS, A. L. Fighting obesity: physical activity has major role. **British medical journal**, Londres, v. 329, n. 7456, p. 53, jul. 2004.

DELPIERRE, C., *et al.* DOHaD: epidemiological researches. **Medecine sciences: M/S**, Paris, v. 32, n. 1, p. 21-26, fev. 2016.

DESJARDINS, E. M., STEINBERG, G. R. Emerging role of AMPK in Brown and Beige adipose tissue (BAT): implications for obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. **Current diabetes reports**, Filadélfia, v. 18, n. 10, p. 80, ago. 2018.

DUNCAN, R. E, *et al.* Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annual review of nutrition**, California, v. 27, p. 79-101, jul. 2007.

EKELUND, U., *et al.* Dose-response associations between accelerometry measured physical activity and sedentary time and all cause mortality: systematic review and

harmonised meta-analysis. **British medical journal**, Londres, v. 366, p. 1-10, ago. 2019.

ENGIN, A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: (Ed.). **Obesity and lipotoxicity**, Nova York, v. 960, p.1-17, ago. 2017.

FALL, C. H. D., *et al.* Weight in infancy and prevalence of coronary heart disease in adult life. **British medical journal**, Londres, v. 310, n. 6971, p. 17-20, nov. 1995.

FASSHAUER, M., BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, Amsterdã, v. 36, n. 7, p. 461-470, jul. 2015.

FERNANDEZ-TWINN, D., OZANNE, S. J. P. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. **Physiology & behavior**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 234-243, jun. 2006.

FERREIRA, D. J. S., *et al.* Mitochondrial dysfunction: maternal protein restriction as a trigger of reactive species overproduction and brainstem energy failure in male offspring brainstem. **Nutritional neuroscience**, Amsterdã, v. 22, n. 11, p. 778-788, nov. 2019.

FLEMMING, W. J. A. F. M. A. Ueber Bildung und Rückbildung der Fettzelle im Bindegewebe, und Bemerkungen über die Structur des letzteren. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 7, n. 1, p. 32-80, 1871.

FREEDLAND, E. S. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. **Nutrition & metabolism**, Londres, v. 1, n. 1, p. 1-24, nov. 2004.

FRIEDMAN, J. M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 973S-979S, mar. 2009.

GIRARD, J., LAFONTAN, M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v. 34, n. 5, p. 439-445, nov. 2008.

GUTHOLD, R., *et al.* Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1· 9 million participants. **The lancet**, Londres, v. 6, n. 10, p. e1077-e1086, out. 2018.

HALES, C. N., *et al.* Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British medical journal**, Londres, v. 303, n. 6809, p. 1019-1022, out. 1991.

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

HILLS, A. P.; STREET, S. J.; BYRNE, N. M. Physical activity and health: "what is old is new again". In: (Ed.). **Advances in food and nutrition research**: Elsevier, v.75, 2015. p.77-95.

HOFFSTEDT, J., *et al.* Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. **Diabetologia**, Berlim v. 53, n. 12, p. 2496-2503, set. 2010.

HOOIJMANS, C. R., *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC medical research methodology**, Londres, v. 14, n. 1, p. 1-9, mar. 2014.

KANE, A. E., *et al.* The association between frailty, the metabolic syndrome, and mortality over the lifespan. **Geronscience**, Zurique, v. 39, n. 2, p. 221-229, abr. 2017.

KEEFER, D. J., CAPUTO, J. L., TSEH, W. Waist-to-Height Ratio and Body Mass Index as Indicators of Cardiovascular Risk in Youth. **Journal of school health** v. 83, n. 11, p. 805-809, nov. 2013.

KELLER, C.; HANSEN, M. S.; COFFIN, C. M.; CAPECCHI, M. R. J. G.; DEVELOPMENT. Pax3: Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. **Genes & development**, Nova York, v. 18, n. 21, p. 2608-2613, nov. 2004.

KIM, S. J., *et al.* AMPK phosphorylates desnutrin/ATGL and hormone-sensitive lipase to regulate lipolysis and fatty acid oxidation within adipose tissue. **Molecular and cellular biology**, Whashington, v. 36, n. 14, p. 1961-1976, jun. 2016.

KOSTER, A., *et al.* Fat distribution and mortality: the AGES-Reykjavik Study. **Obesity**, Whashington, v. 23, n. 4, p. 893-897, abr. 2015.

KUMARI, R., KUMAR, S., KANT, R. An update on metabolic syndrome: metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. **Diabetes & metabolic syndrome**, Amisterdã, v. 13, n. 4, p. 2409-2417, jun. 2019.

LAKSHMY, L. Metabolic syndrome: role of maternal undernutrition and fetal programming. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, Boston, v. 14, n. 3, p. 229-240, set. 2013.

LAMERS, D., *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. **Diabetes**, Nova York, v. 60, n. 7, p. 1917-1925, jul. 2011.

LEDOUX, S., *et al.* Traditional anthropometric parameters still predict metabolic disorders in women with severe obesity. **Obesity**, Maryland, v. 18, n. 5, p. 1026-1032, mai. 2010.

LEHNIG, A. C., *et al.* Exercise training induces depot-specific adaptations to white and brown adipose tissue. **IScience**, Cambridge, v. 11, p. 425-439, jan. 2019.

LEHR, S., HARTWIG, S. SELL, H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. **PROTEOMICS-Clinical applications**, Munique, v. 6, n. 1-2, p. 91-101, jan. 2012.

LEJARRAGA, H. Perinatal origin of adult diseases. **Archivos argentinos de pediatria**, Buenos Aires, v. 117, n. 3, p. e232-e242, jun. 2019.

LEMIEUX, S., DESPRES, J. P. Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. **Diabète & métabolisme**, Paris, v. 20, n. 4, p. 375-393, jul. 1994.

LETO, D., SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nature reviews molecular cell biology**, Londres, v. 13, n. 6, p. 383-396, mai. 2012.

LIN, Z., *et al.* Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 17, n. 5, p. 779-789, mai. 2013.

LÖNN, M., *et al.* Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 24, n. 1, p. 326-331, jan. 2010.

LUNDGREN, M., *et al.* Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. **Diabetologia**, Berlin v. 50, n. 3, p. 625-633, mar. 2007.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilia journal of biology**, São Carlos v. 62, n. 4A, p. 609-14, nov. 2002.

MCFARLANE, S. I., BANERJI, M., SOWERS, J. R. Insulin resistance and cardiovascular disease. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, Springfield, v. 86, n. 2, p. 713-718, fev. 2001.

MCMILLEN, I. C., ROBINSON, J. R. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiological reviews**, Whashington, v. 85, n. 2, p. 571-633, abr. 2005.

MCNAMARA, J. P. Lipid metabolism in adipose tissue during lactation: a model of a metabolic control system. **The journal of nutrition**, Springfield, v. 124, n. suppl\_8, p. 1383S-1391S, ago. 1994.

MOHER, D., *et al.* Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS medicine**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e1000097, jul. 2009.

MOTTILLO, E. P., *et al.* Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 118-129, jul. 2016.

MURPHY, T. M., MILL, J. Epigenetics in health and disease: heralding the EWAS era. **The lancet**, Londres, v. 383, n. 9933, p. 1952-1954, jun. 2014.

NASCIMENTO, L., *et al.* The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, Otatawa, v. 39, n. 8, p. 880-887, ago. 2014.

NECHAD, M. J. B. A. T. E. B. P. T.; NICHOLLS, D. G. Structure and development of brown adipose tissue. **Brown adipose tissue/edited by Paul Trayhurn and David G. Nicholls**, Londres, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. **World Helth Organization**, 2013.

OSMOND, C., *et al.* Early growth and death from cardiovascular disease in women. **British medical journal**, Londres, v. 307, n. 6918, p. 1519-1524, dez. 1993.

OZANNE, S. Metabolic programming in animals: type 2 diabetes. **British medical journal**, Londres, v. 60, n. 1, p. 143-152, nov. 2001.

PAI, L. W., *et al.* The effectiveness of physical leisure time activities on glycaemic control in adult patients with diabetes type 2: A Systematic Review. **JB I library of systematic reviews**, Adelaide, v. 10, n. 42, p. 1-20, ago. 2012.

PAINTER, R. C., *et al.* Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, Oxford, v. 115, n. 10, p. 1243-1249, set. 2008.

PATTERSON, R., *et al.* Sedentary behaviour and risk of all-cause, cardiovascular and cancer mortality, and incident type 2 diabetes: a systematic review and dose response meta-analysis. **Europen journal of epidemiology**, Roma, v. 33, n. 9, p. 811-829, set. 2018.

PEDERSEN, B. K., SALTIN, B. Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian journal of medicine and science in sports**, Copenhagen, v. 25, p. 1-72, dez. 2015.

PEDROZA, A., *et al.* A maternal low-protein diet and neonatal overnutrition result in similar changes to glomerular morphology and renal cortical oxidative stress measures in male Wistar rats. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 164-171, fev. 2019.

QUINTANA-CASTRO, R., *et al.* Cd36 gene expression in adipose and hepatic tissue mediates the lipids accumulation in liver of obese rats with sucrose-induced hepatic steatosis. **Prostaglandins & other lipid mediators**, Nova York, v. 147, p. 106404, abr. 2020.

RAWSHANI, A., *et al.* Adipose tissue morphology, imaging and metabolomics predicting cardiometabolic risk and family history of type 2 diabetes in non-obese men. **Scientific reports**, Londres, v. 10, n. 1, p. 1-13, jun. 2020.

RICQUIER, D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. **The proceedings of the nutrition society**, Londres, v. 64, n. 1, p. 47-52, fev. 2005.

SAMSON, S. L., GARBER, A. J. Metabolic syndrome. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, Filadélfia, v. 43, n. 1, p. 1-23, mar. 2014.

SEBO, Z. L., *et al.* A mesodermal fate map for adipose tissue. **Development**, Cambridge, v. 145, n. 17, p. dev166801, ago. 2018.

SHARMA, A. M., ENGELI, S., PISCHON, T. New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. **Current Hypertension**, Filadélfia, v. 3, n. 2, p. 152-156, abr. 2001.

SILVA-FILHO, R. **Maternal protein restriction induce liver mitochondrial dysfunction on young rats**. 2014. 82f. (Trabalho de conclusão de curso de Bacharelado em Educação Física) - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2014.

STANFORD, K. I., *et al.* A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. **Diabetes**, Nova York, v. 64, n. 6, p. 2002-2014, jun. 2015.

STEPHENSON, E. J., *et al.* Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low-or high-endurance running capacity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, Bethesda, v. 305, n. 3, p. E429-E438, ago. 2013.

STRATTON, R. J., GREEN, C. J., ELIA, M. **Disease-related malnutrition: an evidence-based approach to treatment**. Wallingford: Cabi, 2003.

SUTHERLAND, L. N., *et al.* Exercise and adrenaline increase PGC-1 $\alpha$  mRNA expression in rat adipose tissue. **The Journal of physiology**, Londres, v. 587, n. 7, p. 1607-1617, abr. 2009.

TAJBAKHSH, S., SPÖRLE, R. J. C. Somite development: constructing the vertebrate body. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 1, p. 9-16, jan. 1998.

TREVELLIN, E., *et al.* Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. **Diabetes**, Nova York, v. 63, n. 8, p. 2800-2811, ago. 2014.

VERNOCHET, C., *et al.* Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 16, n. 6, p. 765-776, dez. 2012.

VICTORA, C. G., *et al.* Revisiting maternal and child undernutrition in low-income and middle-income countries: variable progress towards an unfinished agenda. **Lancet**, Londres, abr. 2021.

WARBURTON, D. E., BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. **Current opinion in cardiology**, Filadélfia, v. 32, n. 5, p. 541-556, set. 2017.

WEYER, C., *et al.* Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. **Dietologia**, Berlin, v. 43, n. 12, p. 1498-1506, dez. 2000.

WU, L., **et al.** AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates energy metabolism through modulating thermogenesis in adipose tissue. **Frontiers in physiology**, Lauseane, v. 9, p. 122, fev. 2018.

XITA, N., TSATSOULIS, A. Fetal origins of the metabolic syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova York, v. 1205, n. 1, p. 148-155, set. 2010.

YOUNG, D. R., Sedentary behavior and cardiovascular morbidity and mortality: a science advisory from the American Heart Association. **Circulatin**, Dallas, v. 134, n. 13, p. e262-e279, ago. 2016.

ZHANG, Y., *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, Londres, v. 372, n. 6505, p. 425-432, dez. 1994.

**ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)  
DA UFPE**



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biotérios  
Av. Prof. Moraes Cabral, 123  
51000-000 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (81) 3445-1111  
www.ufpe.br

Recife, 28 de maio de 2019

Ofício nº 28/19

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

Para: Prof. Claudia Jacques Lagranha  
Centro de Vitória de Santo Antão (CAV)  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 0060/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do treinamento físico moderado sobre os padrões epigenéticos induzido pela desnutrição proteica perinatal: avaliação das respostas nas mitocôndrias cardíacas." registrado com o nº 0060/2018 sob a responsabilidade de Prof. Claudia Jacques Lagranha o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/05/2019.

|                                     |                                                                           |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Finalidade                          | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica                                        |
| Vigência da autorização             | 01/06/2019 a 10/06/2019                                                   |
| Espécie/linhagem/raça               | Rato heterogênico                                                         |
| Nº de animais                       | 168                                                                       |
| Peso/Idade                          | Progenitores: macho: 120dias/200-250g.<br>Fêmea: 80 dias/ 150-200g        |
| Sexo                                | 16 (fêmeas) e 152(machos) considerando progenitores e estimativa da prole |
| Origem: Biotério de Criação         | Biotério do Departamento de Fisiologia                                    |
| Destino: Biotério de Experimentação | Biotério do Departamento de Fisiologia                                    |

Atenciosamente,

  
Prof. Sebastião R. F. Silva  
-Presidente CEUA/UFPE  
SIAPE 2343691

## ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO COMO COLABORADOR



### Moderate offspring exercise offsets the harmful effects of maternal protein deprivation on mitochondrial function and oxidative balance by modulating sirtuins

Anderson Apolonio Silva Pedroza <sup>a</sup>, Elenilson M. Bernardo <sup>a</sup>, Allifer R. Pereira <sup>b</sup>,  
Severina Cassia Andrade Silva <sup>c</sup>, Talitta A. Lima <sup>b</sup>, Cristiane de Moura Freitas <sup>b</sup>,  
Jose Carlos da Silva Junior <sup>c</sup>, Dayane A. Gomes <sup>c</sup>, Diorginis S. Ferreira <sup>d</sup>,  
Claudia J. Lagranha <sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, CRI- Federal University of Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>d</sup> Colégio de Educação Física, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, Brazil

Received 16 July 2020; received in revised form 26 December 2020; accepted 8 January 2021

Handling Editor: A. Sirtu

Available online: ■ ■ ■

#### KEYWORDS

Maternal low-protein diet;  
Childhood exercise;  
Heart;  
Oxidative stress;  
Epigenetic

**Abstract** Background and aims: It has been demonstrated that maternal low protein during development induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. Moderate-intensity exercise in early life, conversely, increases the overall cardiac health. Thus, we hypothesize that moderate-intensity exercise performed during young age could ameliorate the deleterious effect of maternal protein deprivation on cardiac bioenergetics.

**Methods and results:** We used a rat model of maternal protein restriction during gestational and lactation period followed by an offspring treadmill moderate physical training. Pregnant rats were divided into two groups: normal nutrition receiving 17% of casein in the diet and undernutrition receiving a low-protein diet (8% casein). At 30 days of age, the male offspring were further subdivided into sedentary (NS and LS) or exercised (NT and LT) groups. Treadmill exercise was performed as follows: 4 weeks, 5 days/week, 60 min/day at 50% of maximal running capacity. Our results showed that a low-protein diet decreases oxidative metabolism and mitochondrial function associated with higher oxidative stress. In contrast, exercise rescues mitochondrial capacity and promotes a cellular resilience to oxidative stress. Up-regulation of cardiac sirtuin 1 and 3 decreased acetylation levels, redeeming from the deleterious effect of protein restriction.

**Conclusion:** Our findings show that moderate daily exercise during a young age acts as a therapeutic intervention opposing the harmful effects of a maternal diet restricted in protein.

© 2021 The Italian Diabetes Society, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author: Rua Alto do Reservatório, s/n55608-080 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brazil. Phone/Fax: (00 55 81) 35233351.  
E-mail address: lagranha@hotmail.com (C.J. Lagranha).

<https://doi.org/10.1016/j.nmcd.2021.01.006>

0939-4753/© 2021 The Italian Diabetes Society, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Silva Pedroza AA et al., Moderate offspring exercise offsets the harmful effects of maternal protein deprivation on mitochondrial function and oxidative balance by modulating sirtuins. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.nmcd.2021.01.006>

## ANEXO C - REGISTRO DO PROTOCOLO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

12/07/2021

[https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display\\_record.php?RecordID=243228](https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=243228)



**PROSPERO**  
International prospective register of systematic reviews

### Effects of protein malnutrition during the perinatal period on adipose tissue development: a systematic review

Allifer Rosendo Pereira, Renata Santos, Mariana Fernandes

#### Citation

Allifer Rosendo Pereira, Renata Santos, Mariana Fernandes. Effects of protein malnutrition during the perinatal period on adipose tissue development: a systematic review. PROSPERO 2021 CRD42021243228 Available from: [https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display\\_record.php?ID=CRD42021243228](https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42021243228)

#### Review question

What are the implications of protein malnutrition during early life on the morphology of white adipose tissue, in murine model?

How can structural changes affect the functionality of white adipose tissue?

What are the possible mechanisms involved?

#### Context and rationale

The nutritional environment has important consequences for health in any period however, malnutrition during periods of gestation and lactation represent a critical point for health throughout life, thanks to physiological and metabolic changes in the fetus that adjust the supply of nutrients to major organs such as the brain, to the detriment of others like adipose tissue. These changes can contribute to the emergence of cardiovascular diseases and metabolic diseases in adulthood insofar as they affect tissue development and consequently its morphology and function. Adipose tissue is an organ that normally stores energy in the form of triglycerides in times of excess of nutrients and mobilization of energy in the form of fatty acids when necessary. However, the understanding of the role of adipose tissue has evolved, currently that adipose tissue is not simply a reservoir of energy, but also acts as an organ metabolically dynamic and important. In rodents as well as in humans, a dysfunction in adipose tissue can lead to complications in other tissues such as liver and muscle skeletal system leading to a greater predisposition to chronic-metabolic diseases. Thus, understanding how nutritional problems can affect adipose tissue in early life is essential for understanding some associated pathologies.

#### Searches

PubMed, Scopus, Web of Science and reference lists and review articles.

No restrictions will be placed on language or dates.

Search terms used will be according to MeSH and key-words:

# Protein-Energy Malnutrition OR protein deficiency\* (with \* representing inclusion of wildcard word endings)

# Gestation OR Pregnancy\* (with \* representing inclusion of wildcard word endings)

# Lactation OR Breast Feeding\* (with \* representing inclusion of wildcard word endings)

# Adipose tissue OR Adipose Tissue, White\* (with \* representing inclusion of wildcard word endings)

#### Study designs to be included

##### Inclusion criteria:

[https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display\\_record.php?RecordID=243228](https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=243228)

1/5

## ANEXO D - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA

15/02/2023 16:02

Preparing your materials

Cambridge Core

[Home](#) > [journals](#) > [British Journal of Nutrition](#) > [journal information](#) > [Author instructions](#)  
> [Preparing your materials](#)

English

 | 

Français

British Journal of Nutrition

An International Journal of Nutrition

Search British Journal of Nutrition

Search within full text  
Search within journal

Other actions



( <http://www.cambridge.org/core/societies/nutrition-society> )

Published on behalf of The Nutrition Society

### Preparing your materials

[Scope](#) | [Article Types](#) (<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/information/author-instructions/preparing-your-materials#articletypes>) | [Review Articles](#) | [Letters to the Editor](#) | [Submission](#) | [Special considerations](#) | [Publishing Ethics](#) | [Policy on Prior Publication](#) (<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/information/author-instructions/preparing-your-materials#policyonpriorpublication>) | [Detailed Manuscript Preparation Instructions](#) | [Manuscript format](#) | [References](#) | [Figures](#) | [Tables](#) | [Supplementary Material](#) | [AuthorAID](#) | [Author Hub](#) (<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/information/author-instructions/preparing-your-materials#authorhub>)

### Submission

<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/information/author-instructions/preparing-your-materials>

1/15

## ANEXO E - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA

### JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

##### Mission Statement

*Journal of Developmental Origins of Health and Disease (J DOHaD)* is the official scientific journal of the International Society for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).

JDOHaD publishes leading research in the field of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). The Journal focuses on the environment during early pre-natal and post-natal animal and human development, interactions between environmental and genetic factors, including environmental toxicants, and their influence on health and disease risk throughout the lifespan. JDOHaD publishes work on developmental programming, fetal and neonatal biology and physiology, early life nutrition, especially during the first 1,000 days of life, human ecology and evolution and Gene-Environment Interactions. JDOHaD also accepts manuscripts that address the social determinants or education of health and disease risk as they relate to the early life period, as well as the economic and health care costs of a poor start to life. Accordingly, JDOHaD is multi-disciplinary, with contributions from basic scientists working in the fields of physiology, biochemistry and nutrition, endocrinology and metabolism, developmental biology, molecular biology/ epigenetics, human biology/ anthropology, and evolutionary developmental biology. Moreover clinicians, nutritionists, epidemiologists, social scientists, economists, public health specialists and policy makers are very welcome to submit manuscripts.

The journal includes original research articles, short communications and reviews, and has regular themed issues, with guest editors; it is also a platform for conference/workshop reports, and for opinion, comment and interaction.

##### Categories of papers

**Original research articles** - This category is intended for full-scale basic, clinical or epidemiological studies including large controlled trials. Articles may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered for unusually large or complex studies.)

**Brief reports** - This category is for smaller, self-contained laboratory or clinical studies or analyses. Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references, figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words.

**Rapid communications** - This category is for 'fast-breaking' new work, which is of great potential interest and can be succinctly presented.

Authors who wish to submit a rapid communication must first send an abstract to the Editor in Chief, Michael Ross (DOHaDeditor@cambridge.org) for approval of submission in this category.

Submissions that do not have prior approval will be reviewed on the regular track.

Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references, figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words. Rapid communications will be reviewed and published on a "fast track" basis.

**Reviews** - J DOHaD will publish scholarly, comprehensive reviews that summarize and critically evaluate research in the field addressed and identify future implications. Reviews will be invited by the Editors but may also be submitted. Authors wishing to submit papers in this category are advised to contact either the Editor-in-Chief or appropriate Associate Editor before doing so. Reviews may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered if justified by the scope of the Review).