



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

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE OS MECANISMOS
EPIGENÉTICOS, BALANÇO OXIDATIVO E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL
INDUZIDOS PELA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: Avaliação das Respostas
Mitocondriais Cardíacas**

**RECIFE
2022**

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE OS MECANISMOS
EPIGENÉTICOS, BALANÇO OXIDATIVO E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL
INDUZIDOS PELA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: Avaliação das Respostas
Mitocondriais Cardíacas**

Tese apresentada como um dos requisitos
para o cumprimento parcial das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia Jacques
Lagranha

Coorientador: Prof^o Dr^o Diorginis José
Soares Ferreira

**RECIFE
2022**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Pedrosa, Anderson Apolonio da Silva

Efeito do treinamento físico moderado sobre mecanismos epigenéticos, balanço oxidativo e bioenergética mitocondrial induzidos pela desnutrição proteica materna : avaliação das respostas mitocondriais cardíacas / Anderson Apolonio da Silva Pedrosa. – 2022.

84 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Jacques Lagranha.

Coorientador: Prof. Dr. Diorginis José Soares Ferreira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Coração - Doenças. 2. Gravidez - Aspectos nutricionais. 3. Degeneração (Patologia). I. Lagranha, Claudia Jacques (orientadora) II. Ferreira, Diorginis José Soares (coorientador). III. Título.

616.12

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-128

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE OS MECANISMOS EPIGENÉTICOS, BALANÇO OXIDATIVO E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL INDUZIDOS PELA DESNUTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: Avaliação das Respostas Mitocondriais Cardíacas

Tese apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha

Coorientador: Prof^o Dr^o Diorginis José Soares Ferreira

Aprovado em: 11/03/2022

Prof^a Dr^a Claudia Jacques Lagranha (Orientador)
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão da UFPE

Prof^o Dr^o Diorginis José Soares Ferreira (Co-orientador)
Colegiado de Educação Física da Universidade do Vale de São Francisco

Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – UFPE

Prof^o Dr^o José Antônio dos Santos
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – UFPE

Prof^o Dr^o Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências – UFPE

RECIFE
2022

AGRADECIMENTOS

Chegando nesse momento tão especial de minha vida é impossível não parar para pensar em tudo que vivi até o dia de hoje. Como um filme, passam por minha cabeça pequenos fragmentos de memória que me auxiliam a construir esse agradecimento.

Seria impossível começar sem citar Jesus, o grande responsável por colocar em minha vida pessoas especiais e conduzir minha caminhada estando ao lado desde sempre. Mas antes, tem algo que me chama a atenção: O fato de estudar desde a iniciação científica a forte influência que o ambiente tem sobre um indivíduo, sendo ele modulado de acordo com o tipo de estilo que lhe é dado. Pois é, esse sou EU, modulado por tantas batalhas, modulado por decepções, modulado por amizades sinceras, modulado pelo AMOR que sinto por cada um que fez e faz parte de minha vida.

O que seria de mim sem a pessoa mais importante de minha vida? Sim minha mãe Solange, é a senhora!!! Mulher guerreira, que sacrificou tanta coisa para dar a mim e meus irmãos a melhor criação possível. Posso dizer que sinto seu amor desde o tempo que me desenvolvia em seu ventre. Obrigado por tudo. Sou o homem que sou hoje graças a senhora. Tenho tanto orgulho da senhora! Te amo minha mãe.

Agradeço ao meu Pai Adilson por todo carinho, tamanha é minha alegria em ver como estamos unidos hoje. Te amo pai.

Do fruto do casamento de meus pais vieram meus irmãos biológicos, Ezequias e Ezequiel! Todos os momentos com vocês são especiais, pude ver os primeiros passos de cada um dos dois e sou grato por cada um deles, amo vocês. Meu irmão paterno Gabriel, tenho tanto orgulho de você, te amo!!!

Minha família paterna e materna, amo vocês!!!

Existem as famílias biológicas e existem as famílias que o destino (Deus) nos apresenta. Do fundo do meu coração à Bicamada Lipídica: Darc, Rudá e Vivi, amo vocês... Que saudade!

Natália Souza, Mateus Dutra, Jaqueline, Cris, Fred, Jefferson, Zuzu, Thayná, muito obrigados por fazerem parte de minha vida, em tão pouco tempo de convívio criamos um laço forte e digo: amo todos.

Agradeço a todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, em especial aos professores Léucio e Ana Durce, pessoas por quem tenho grande admiração e respeito.

Obrigado a professora Day e aos participantes do Laboratório de Neuro endocrinologia e Metabolismo, em especial a Júnior por toda paciência e ajuda.

O que seria minha carreira acadêmica sem a presença de todos vocês que fazem parte do aos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício (LABMEX)? Mais importante que a própria carreira acadêmica pergunto? O que seria de meu amadurecimento pessoal se eu não tivesse vocês em minha vida?

Voltando para 2012 (ano que entrei no LABMEX), cito Cris, Lu, Regis, Sandrinha, Virginia, Yuri, Débora, Mychely, Tatá, Aline, Diego, Didi... muito obrigado por terem de alguma forma contribuído para minha formação. Cada um tem uma história linda no laboratório.

Os anos foram passando, alguns ciclos foram abertos, alguns foram fechados e outros ainda continuam. Confesso que expressar em um texto os 10 anos de minha história no nesse laboratório não está sendo uma tarefa fácil. Mas vamos continuar...

Dos ciclos que estão se abrindo no laboratório o que tenho a dizer a Osmar, Vanessa, Jhonatas, Guilherme, Thyago, Deyse e Neto é: todos tem um futuro brilhante, estou na torcida por cada um, sempre que precisarem de algo podem contar comigo. Amo vocês!

Os “Pós da Jacques 1 e 2”, Rudá, Cássia, Dani, Nilson e Diego passamos por muitos momentos: rimos, choramos, nos desesperamos... sendo que tudo foi acontecendo e SEMPRE ESTIVEMOS UNS AO LADO DOS OUTROS, sempre dando apoio, amo vocês.

Winglinson e Letícia, meu “TRIO DO CAFEZINHO”, eita que saudade já estou de nossos momentos, eita que saudade de nossas conversas, risos e de todas os finais de tardes que passamos juntos, amo vocês.

Allifer, que bom poder te chamar de amigo, I am Groot! Tatá, Ramom, Gisele, Welligton, Reginaldo e demais que fazem parte do LABMEX 18:00, cada momento que passamos juntos vai ficar em minha memória para sempre, amo vocês.

Didi, tamanha é minha admiração por ti, ver seu crescimento é algo inspirador, te agradeço por aceitar o convite de ser meu coorientador do doutorado. Muito obrigado por todos os ensinamentos, amo você!!!

Nada desses acontecimentos e desses vínculos teriam acontecido sem os grandes espelhos de nosso laboratório, as professoras Mariana e Claudia.

Professora Mariana, minha eterna coorientadora, minha amiga, um dos reencontros mais maravilhosos que tive nessa vida. Sim, essa é a sensação! Quão grande é amor que tenho em meu coração pela senhora e por sua família (Fernando, Nanda e Maísa) sou grato por tê-la em minha vida, sou grato por cada momentos que passamos juntos. Te amo!!!

Outro reencontro marcante foi com a senhora, Professora Claudia Lagranha (para mim: Claudia Yoda Lagranha), minha orientadora, minha mãe, minha amiga, minha confidente... Deus é prova do amor e carinho que tenho pela senhora prof!!! Só tenho a lhe agradecer por tudo que a senhora fez, por todo conhecimento, por todos os conselhos, por todos os e-mails (kkkkkkk), e principalmente pela oportunidade e confiança de trabalhar todos esses anos ao seu lado! Com lágrimas nos olhos digo que a partir do fim desse meu ciclo, não seremos mais orientando e orientadora, mas tenho certeza de que nossa conexão é para toda a vida. Muito obrigado!!! Obrigado por me inspirar e de forma direta e indireta, me fazer um ser humano melhor. Lhe amo muito viu!

RESUMO

Estudos demonstram uma estreita correlação entre o estado nutricional inadequado durante os períodos de gestação e de lactação na gênese de doenças metabólicas e cardiovasculares. Por outro lado, o exercício físico moderado é apontado como um modulador positivo do metabolismo cardíaco, sendo ele uma estratégia para combater o aparecimento e/ou progressão de doenças crônicas. Assim, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico moderado sobre os mecanismos epigenéticos, balanço oxidativo e bioenergética mitocondrial cardíaca de ratos submetidos a desnutrição proteica materna. Inicialmente, ratas prenhas foram divididas em dois grupos experimentais: controle (C) e desnutrido (D), que receberam respectivamente uma dieta contendo 17% e 8% de caseína durante toda a gestação e lactação. Durante os dias 26, 27 e 28 os animais realizaram um teste de adaptação em esteira, aos 30 dias de vida, os grupos controle (C) e desnutridos (D) foram subdivididos não treinados (CNT e DNT) e treinados (CT e DT), sendo então submetidos a um programa de treinamento físico moderado (50% da capacidade máxima de corrida) em esteira ergométrica durante 4 semanas durante 1 hora por dia. Aos 61 dias, 24 horas após a última sessão de exercício, o tecido cardíaco foi coletado e as seguintes análises bioquímicas foram realizadas: atividade enzimática da citrato sintase, níveis totais de NAD^+ e NADH , consumo de oxigênio mitocondrial, produção de espécies reativas mitocondriais, inchamento mitocondrial, expressão gênica e proteica de moduladores epigenéticos e níveis de acetilação do resíduo de lisina. De forma resumida, observamos que os animais que receberam uma dieta com menor teor de proteínas apresentaram prejuízo no metabolismo e função mitocondrial, estresse oxidativo, maior produção de espécies reativas e menor resistência à captação de cálcio. Além de aumento da expressão gênica das sirtuínas 1 e 3, sendo este aumento contrário em relação a expressão proteica, além de aumentos nos níveis de acetilação. Em contrapartida, o treinamento físico moderado foi capaz de induzir alterações que minimizaram os efeitos deletérios causados pela restrição proteica. Em conjunto, nossos dados sugerem que o treinamento físico moderado, quando aplicado de forma precoce, pode ser uma ferramenta que pode postergar ou até mesmo impedir o desenvolvimento de doenças crônicas associadas a disfunções mitocondriais cardíacas causadas por uma restrição proteica no início da vida.

Palavras-chave: Insultos Nutricionais; Treinamento Físico Moderado; Mitocôndria; Epigenética.

ABSTRACT

Studies demonstrate a close correlation between inadequate nutritional status during gestation and lactation periods in the genesis of metabolic and cardiovascular diseases. On the other hand, moderate physical exercise is seen as a positive modulator of metabolism, and cardiac function is a strategy to combat the onset and / or progression of chronic diseases. Thus, this study aimed to investigate the effects of moderate physical training on epigenetic mechanisms, oxidative balance and cardiac mitochondrial bioenergetics in rats submitted to maternal protein malnutrition. Initially, pregnant rats were divided into two experimental groups: control (C) and malnourished (D), who received respectively a diet containing 17% and 8% casein throughout pregnancy and lactation. During the 26th, 27th and 28th days, the animals performed an adaptation test on a treadmill, at 30 days of life, the control (C) and malnourished (D) groups were subdivided untrained (CNT and DNT) and trained (CT and DT), being then submitted to a program of moderate physical training (50% of the running capacity) on a treadmill for 4 weeks for 1 hour per day. At 61 days, 24 hours after the last exercise session, cardiac tissue was collected and the following biochemical analyzes were performed: enzyme activity of citrate synthase, total levels of NAD⁺ and NADH, consumption of mitochondrial oxygen, production of reactive mitochondrial species, mitochondrial swelling, gene and protein expression of epigenetic modulators and lysine residue acetylation levels. In summary, we observed that animals that received a diet with a lower protein content showed impairment in mitochondrial metabolism and function, oxidative stress, greater production of reactive species and less resistance to calcium uptake. In addition to an increase in the gene expression of sirtuins 1 and 3, this increase being contrary to protein expression, in addition to increases in acetylation levels. In contrast, moderate physical training was able to induce changes that minimized the deleterious effects caused by protein restriction. Taken together, our data suggest that moderate physical training, when applied early, can be a tool that can delay or even prevent the development of chronic diseases associated with cardiac mitochondrial dysfunction caused by protein restriction in early life.

Key words: Nutritional Insults; Moderate Physical Training; Mitochondria; Epigenetic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 PERÍODOS CRÍTICOS DO DESENVOLVIMENTO E TEORIA DA ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DOENÇA DOHAD	13
2.2 DESNUTRIÇÃO PROTEICA NO PERÍODO CRÍTICO DO DESENVOLVIMENTO E SUA RELAÇÃO COM AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	14
2.3 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICA	17
2.4 TECIDO CARDÍACO.....	20
3 OBJETIVO	42
3.1. GERAL.....	42
3.2. ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS E DIETA.....	45
4.2 PROTOCOLO DE TREINO.	44
4.3 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS	44
4.4 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS.....	44
4.5 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS	45
4.6 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CITRATO SINTASE.....	45
4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE NAD ⁺ E NADH.....	45
4.8 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS COM AS MITOCÔNDRIAS ISOLADAS	46
4.9 QUANTIFICAÇÃO DA VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL	46
4.10 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS TOTAIS	46
4.11 QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE MITOCONDRIAL DE CAPTAÇÃO DE CÁLCIO	47
4.12 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	47
4.13 AVALIAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA.....	48
4.14 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA.....	49

4.15 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS SIRTUÍNAS PELA METODOLGIA DE “REAL TIME-PCR”	50
4.16 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DAS SIRTUÍNAS 1 E 3 E DOS NÍVEIS DE ACETILAÇÃO DAS LISINAS CARDÍACAS	51
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A – MODERATE OFFSPRING EXERCISE OFFSETS THE HARMFUL EFFECTS OF MATERNAL PROTEIN DEPRIVATION ON MITOCHONDRIAL FUNCTION AND OXIDATIVE BALANCE BY MODULATING SIRTUINS	72

1 INTRODUÇÃO

Uma das prioridades da Organização Mundial de Saúde (OMS) refere-se ao combate às doenças crônico-degenerativas. A OMS inclui como estratégias para combater tais doenças uma alimentação adequada e mudanças do estilo de vida, com um estilo de vida mais ativo, priorizadas desde a infância. Evidências epidemiológicas e experimentais têm mostrado que uma privação nutricional na infância aumentam o risco de obesidade e de doenças correlatas entre elas as cardiovasculares tais como hipertensão na vida adulta (BARKER, 1990; 1999a; 2007; BARKER; OSMOND, 1986; BARKER; OSMOND; LAW, 1989).

Durante o período de privação nutricional, o feto interage dinamicamente com o meio a fim de adquirir vantagens de sobrevivência para o futuro. O termo "plasticidade fenotípica" refere-se a essa capacidade de mudanças do fenótipo em resposta às alterações ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento e às repercussões na vida adulta (BATESON; BARKER; CLUTTON-BROCK; DEB *et al.*, 2004; GLUCKMAN; HANSON, 2004; GLUCKMAN; HANSON; SPENCER, 2005). Estudos vem mostrando que muitas dessas mudanças no fenótipo são induzidas por modificações nos mecanismos epigenéticos, sendo a desnutrição proteica perinatal um dos fatores ambientais mais bem estudados como indutor de plasticidade fenotípica por modulação dos mecanismos epigenéticos (BARKER, 1999b; BEAUCHAMP; HARPER, 2016; GUEANT; DAVAL; VERT; NICOLAS, 2012; KEATING; EL-OSTA, 2015; MARTINEZ; PENTINAT; RIBO; DAVIAUD *et al.*, 2014; RAVELLI; VAN DER MEULEN; OSMOND; BARKER *et al.*, 1999).

O estilo de vida e os fatores ambientais possuem forte influência sobre a saúde por meio de modificações epigenéticas, e o exercício é um dos fatores críticos que pode desempenhar um papel positivo na prevenção de doenças (DENHAM, 2018). Estudos experimentais e clínicos mostram que a atividade física regular é potencialmente a melhor estratégia para combater o aparecimento e/ou progressão de doenças crônicas (BARBOSA; LUCIANO; VITTO; CESCO NETTO *et al.*, 2012; DAVIS, 2004). Desta forma, o treinamento físico moderado é recomendado como uma forma não-farmacológica para o tratamento de diversas doenças cardíacas, entre elas hipertensão e infarto do miocárdio (MARTINEZ; NICOLAU; LAGE; TOSCHI-DIAS *et al.*, 2011; ZHANG; KAWACHI; MIURA; UEHARA *et al.*, 2013). Os mecanismos associados aos efeitos positivos do treinamento físico em intensidade leve a moderada inclui a modulação do estado REDOX celular e mitocondrial por modular padrões de respiração mitocondrial cardíacas (ASCENSAO; MAGALHAES; SOARES; FERREIRA *et al.*, 2005).

Apesar de alguns estudos já mostrarem o papel benéfico do treinamento físico moderado na função mitocondrial, não se tinha na literatura trabalhos mostrando se o treinamento físico moderado em ratos juvenis poderia modular de forma positiva os efeitos epigenéticos induzido pela desnutrição proteica perinatal em mitocôndrias cardíacas.

O desenvolvimento dessa tese levou a estruturação do artigo científico intitulado “*Moderate Exercise offsets Harmful Effects of the Protein Deprivation on Mitochondrial function and Oxidative balance: role of sirtuins.*”, o qual foi publicado na revista “*Nutrition metabolism & cardiovascular diseases*”, de fator de impacto 4,22 e Qualis BI em Ciências Biológicas II. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.01.006>.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PERÍODOS CRÍTICOS DO DESENVOLVIMENTO E TEORIA DA ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DOENÇA DOHAD

Durante a gestação, lactação e primeira infância o organismo depara-se com uma forte interação com as circunstâncias ambientais nas quais o mesmo se encontra, esta fase é denominada de “período crítico do desenvolvimento” (DOBBING, 1964; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; WINICK; ROSSO; BRASEL, 1972). O período crítico do desenvolvimento é marcado por fases de rápida proliferação e diferenciação celular, característica esta que torna o organismo mais sensível a condições adversas impostas a ele (DOBBING; SANDS, 1985).

Um dos principais exemplos dessas condições adversas são os desequilíbrios nutricionais, que quando ocorridos nas fases pré e pós natal, induzem o organismo a uma série de adaptações necessárias à sobrevivência (como por exemplo diminuição na taxa de divisão celular), induzindo alterações fisiológicas e morfológicas permanentes e/ou temporárias, que aumentam a predisposição às doenças crônicas na vida adulta (BARKER; FORSEN; ERIKSSON; OSMOND, 2002; BERGLUND; GARCIA-VALDES; TORRES-ESPINOLA; SEGURA *et al.*, 2016; DOBBING; SANDS, 1985; HANSON; GLUCKMAN, 2011).

Do ponto de vista histórico, tal relação começou a ser percebida no ano 1934 por Kermack *et al*, que após realizarem um levantamento epidemiológico, surpreenderam-se ao constatar que o ambiente vivido durante os períodos mais precoces da vida, foi um fator importante na saúde e na taxa de mortalidade de indivíduos nascidos na Inglaterra e Suécia, entre meados do século XVIII e início do século XIX (KERMACK; MCKENDRICK; MCKINLAY, 1934). Mesmo não sendo o objetivo central da pesquisa de Kermack, tais achados tornaram-se umas das primeiras descobertas documentadas acerca do período crítico do desenvolvimento (KERMACK; MCKENDRICK; MCKINLAY, 1934). Anos mais tarde, em um estudo de coorte histórico com 300 mil homens nascidos entre 1944 e 1945 que foram expostos à uma restrição alimentar severa durante a segunda guerra mundial, conhecida como a “fome holandesa”, Ravelli *et al* 1976 relataram que a má nutrição pré e pós-natal relacionou-se com um retardo do crescimento fetal, mortes prematuras e aumentos significativos na incidência de obesidade (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976).

Forsdahl (1977), reforçou a teoria de que o ambiente nas fases iniciais do desenvolvimento tinha forte influência na saúde cardiovascular em idades mais tardias e

acrescentou que, as chances no aparecimento de doenças cardíacas ateroscleróticas estavam aumentadas no grupo estudado que apresentou melhorias no padrão de vida quando comparado ao grupo que permaneceu em situações menos favoráveis (FORSDAHL, 1977). Barker *et al* 1989, relatam um risco reduzido para manifestações de doenças isquêmicas cardíaca em indivíduos britânicos que foram bem nutridos na infância (BARKER; WINTER; OSMOND; MARGETTS *et al.*, 1989). Com base em tais achados, foi levantada a “hipótese do fenótipo poupador” (thrifty phenotype hypothesis), que propunha a ideia de que o feto seria capaz de adaptar-se a um ambiente intrauterino adverso, reajustando o uso dos suprimentos energéticos reduzidos, no sentido de garantir a sua sobrevivência (HALES; BARKER, 1992). Porém, tal processo levaria ao adaptativação, induzindo o favorecimento metabólico de órgãos nobres (cérebro, coração, fígado, rim) em detrimento de outros, conferindo alterações persistentes no crescimento e função dos tecidos (HALES; BARKER, 1992).

Um conjunto de estudos publicados posteriormente impulsionaram a ideia de que condições desfavoráveis no desenvolvimento poderiam ter influência sobre susceptibilidade à doenças em idades mais tardias da vida, essas pesquisas convergiram para o levantamento da Teoria da Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença (DOHaD) (BARKER; FORSEN; ERIKSSON; OSMOND, 2002; ERIKSSON; FORSEN; TUOMILEHTO; OSMOND *et al.*, 2000; FRANKEL; ELWOOD; SWEETNAM; YARNELL *et al.*, 1996; LAWLOR; BATTY; MORTON; DEARY *et al.*, 2005; LEON; LITHELL; VAGERO; KOUPILOVA *et al.*, 1998; MARTYN; BARKER; OSMOND, 1996; STEIN; FALL; KUMARAN; OSMOND *et al.*, 1996). Segundo esta teoria, que o ambiente pode alterar a estrutura e função dos órgãos, o DOHaD vem norteia até os dias atuais todas as pesquisas voltadas para as manifestações de doenças crônicas degenerativas decorrentes dos estímulos ambientais sofridos nos períodos pré e pós-natal e que, boa parte dessas manifestações ocorrem em função do desenvolvimento da obesidade ou desnutrição (SCHNABEL; BACCARELLI; LIN; ELLINOR *et al.*, 2012).

Estudos com modelos animais foram desenvolvidos para uma melhor compreensão dos efeitos da nutrição na gestação, lactação e infância sobre o metabolismo, crescimento, desenvolvimento do organismo e sobre os principais processos envolvidos na gênese de diversas doenças. Visto que, a nutrição é provavelmente o maior agente influenciador ambiental que exerce um papel fundamental na gênese de diversas patologias (BRAY, 1985; BRESLOW, 1952; FORSDAHL, 1977; HAHN, 1984; MCCANCE, 1962; PI-SUNYER, 1993).

2.2 DESNUTRIÇÃO PROTEICA NO PERÍODO CRÍTICO DO DESENVOLVIMENTO E SUA RELAÇÃO COM AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A desnutrição é caracterizada como um déficit no balanço energético e proteico, o que pode prejudicar o funcionamento de vários processos fisiológicos. As taxas de desnutrição mundial são alarmantes, no ano de 2017, quase metade de todas as mortes em crianças menores de 5 anos foram atribuídas a desnutrição (UNICEF, 2018). Estudos epidemiológicos tem mostrado que a desnutrição na infância aumentam as chances do desenvolvimento de obesidade e doenças correlatas, possuindo papel fundamental na saúde em períodos mais tardes na vida (HANSON; GLUCKMAN, 2011; HAO; ZHANG; YUAN; YANG *et al.*, 2010).

Postula-se que o baixo peso ao nascer é um forte indicativo de saúde e nutrição materna e neonatal (ERIKSSON; FORSEN; TUOMILEHTO; OSMOND *et al.*, 2000; ROY, 2018). O sul da Ásia tem a maior incidência de baixo peso ao nascer, com um quarto dos seus recém-nascidos pesando menos de 2.500 gramas (UNICEF, 2018). No que diz respeito à desnutrição mundial, as populações mais afetadas são aquelas que vivem em condições de desenvolvimento socioeconômicos limitados (WHO, 2017).

Quando imposta nas fases iniciais do desenvolvimento, a desnutrição predispõe à um maior risco de perda da função de diversos tecidos com posterior elevações da pressão arterial e da morbidade cardiovascular (EDVARDSSON; STEINTHORSDOTTIR; ELIASDOTTIR; INDRIDASON *et al.*, 2012; VIEIRA-FILHO; LARA; SILVA; SANTOS *et al.*, 2011; VILLAR-MARTINI; CARVALHO; NEVES; AGUILA *et al.*, 2009). Em busca de uma melhor compreensão sobre o impacto dessas alterações ambientais ocorridas no início da vida com as mudanças fenotípicas e a maior predisposição à doenças crônicas não degenerativas a longo prazo, à exemplo das doenças cardiovasculares, a comunidade científica vêm dando ênfase aos estudos que avaliem essas manifestações patológicas em níveis fisiológicos, teciduais, celulares e moleculares (ALMEIDA; DIAS-ROCHA; SOUZA; MUROS *et al.*, 2017; BADR; MOHANY, 2011; BERGLUND; GARCIA-VALDES; TORRES-ESPINOLA; SEGURA *et al.*, 2016; COLLDEN; BALLAND; PARKASH; CARON *et al.*, 2015; NATT; BARCHIESI; MURAD; FENG *et al.*, 2017). Dentre eles, a dieta materna com menores valores proteicos durante a gestação e/ou lactação um dos modelos experimentais mais estudados para avaliação das desordens associadas a danos cardiovasculares (BARKER, 1995).

Ozaki e colaboradores (2001) observaram que uma redução global moderada da dieta em ratas grávidas elevou a pressão arterial diastólica, sistólica e média em filhotes adultos, tanto em machos quanto em fêmeas, além disso, seus resultados mostram mudanças na função vascular da artéria periférica (OZAKI; NISHINA; HANSON; POSTON, 2001). Desai e colaboradores (2005), estudando filhotes nascidos de ratas que receberam uma restrição

alimentar de 50%, observaram uma diminuição do peso corporal ao nascer, contudo esses animais apresentaram-se mais pesados aos 9 meses de idade além de uma redução no peso dos rins, coração e fígado (DESAI; GAYLE; BABU; ROSS, 2005). No estudo de Barros e colaboradores (2015), avaliaram ratos adultos nascidos de mães alimentadas com uma dieta contendo baixos valores proteicos durante a gestação e lactação, seus resultados mostraram que os animais apresentaram um aumento na pressão arterial e no tônus simpático cardiovascular (BARROS; DE BRITO ALVES; NOGUEIRA; WANDERLEY *et al.*, 2015).

Nos estados de carência nutricional, sobretudo crônicos, a ausência de determinados substratos mais que outros, repercutem sobre o equilíbrio dinâmico normal, demonstrando uma hierarquia bioquímica, imperceptível quando o organismo se mantém em homeostase. Dentro dessa hierarquia, destacam-se as proteínas, devido à sua importante participação nas estruturas de órgãos e tecidos e de sua atuação na síntese enzimática, assim como de hormônios proteicos, sendo elas classificadas como macromoléculas imprescindíveis a homeostase metabólica (TRINDADE; DE NOBREGA; TONETE, 1986).

Desde o ano de 2014, nosso laboratório (Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício – LABMEX) vem colaborando com a comunidade científica através publicações que buscam entender os mecanismos moleculares envolvidos com a desnutrição proteica materna e gênese das doenças cardiovasculares.

Avaliando o efeito uma dieta materna com baixo teor de proteína no tecido cardíaco de animais aos 100 dia de vida, Nascimento e colaboradores (2014), identificaram uma redução capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial acompanhado de estresse oxidativo e menores atividades enzimáticas metabólica. Neste estudo foi hipotetizado que um aumento da produção de espécies reativas totais e diminuição da capacidade antioxidante induzidos pela restrição de proteínas durante o desenvolvimento poderiam potencializar a progressão de doenças cardíacas na idade adulta (NASCIMENTO; FREITAS; SILVA-FILHO; LEITE *et al.*, 2014). Outro estudo também realizado em nosso centro acadêmico, utilizando o mesmo modelo experimental, revelou que ratos adultos (90 dias) filhotes de ratas que receberam dieta com baixo teor de proteína, durante a gestação e lactação, apresentaram um significativo aumento da pressão arterial (DE BRITO ALVES; NOGUEIRA; DE OLIVEIRA; DA SILVA *et al.*, 2014).

Sendo o tronco encefálico composto por grupos de neurônios responsáveis pela regulação neural do sistema cardiovascular e os rins pela responsáveis pela regulação a médio e longo prazo da pressão arterial, buscamos avaliar o impacto do mesmo protocolo de restrição proteica materna sobre esses tecidos (FELDBERG; GUERTZENSTEIN, 1972; GUYENET,

2006; TSAI; WU; PENG; YANG *et al.*, 2017). Ferreira e colaboradores (2016), observou no tronco encefálico de ratos aos 22 dias de vida que a restrição proteica induziu um aumento na produção de espécies reativas totais com uma diminuição na defesa antioxidante e no estado REDOX (FERREIRA; DA SILVA PEDROZA; BRAZ; DA SILVA-FILHO *et al.*, 2016). Diminuição das capacidades antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo no córtex renal de ratos aos 30 dias de vida foram encontradas no estudo Pedroza e colaboradores (2019), além do estresse oxidativo, o estudo mostrou alterações na morfologia dos glomérulos e maiores depósitos no conteúdo de colágeno glomerular (PEDROZA; FERREIRA; SANTANA; DA SILVA *et al.*, 2019). Estresse oxidativo e alterações no metabolismo do tronco encefálico também foram observados no estudo de Ferreira e colaboradores (2016), que investigou aos 100 dias de vida as repercussões da desnutrição durante o período de gestação e lactação (FERREIRA; LIU; FERNANDES; LAGRANHA, 2016).

Além do estresse oxidativo e danos mitocondriais, as alterações nos mecanismos epigenéticos vem ganhando espaço cada vez maior para a melhor compreensão dos mecanismos por trás do surgimento das doenças cardiovasculares induzidas por insultos nutricionais.

2.3 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICA

A primeira descrição de epigenética data da década de 40, pelo biólogo britânico Conrad & Waddington (TRONICK; HUNTER, 2016; WADDINGTON, 2012). Ele utilizou esse termo para descrever a forma como um mesmo genótipo é capaz de promover a expressão de diferentes fenótipos durante o desenvolvimento dos organismos (LANDGRAVE-GOMEZ; MERCADO-GOMEZ; GUEVARA-GUZMAN, 2015; WADDINGTON, 2012). O termo epigenética refere-se à todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional sem alteração na sequência dos nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (DNA). A epigenética inclui o estudo de como os padrões de expressão são passados para os descendentes, como ocorre a mudança de expressão espaço temporal de genes durante a diferenciação de um tipo de célula e como fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos (SHIRODKAR; MARSDEN, 2011; XIAO; YE, 2011). Os mecanismos epigenéticos estão relacionados principalmente à alterações no DNA e na cromatina, dentre estes os mais estudados são a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais em histonas, tais como

acetilação e fosforilação (COSTELLOE; FITZGERALD; MURPHY; FLAUS *et al.*, 2006; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

O processo de metilação do DNA consiste na adição covalente de um radical metil (CH₃-) em uma base citosina, convertendo-a em 5-metilcitosina. As citosinas alvo de metilação encontram-se ligadas à guanina e localizam-se principalmente em regiões promotoras de transcrição gênica (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007; RODENHISER; MANN, 2006). Por sua vez, as histonas são proteínas que possuem muitos aminoácidos com cargas positivas o que permite atrações com a molécula de DNA. As histonas possuem um domínio globular, onde o filamento de DNA se envolve, e extremidades amino-terminais flexíveis (também denominadas de caudas) ricas nos aminoácidos lisina, arginina, serina e treonina que são os principais resíduos alvo das modificações pós-traducionais (COSTELLOE; FITZGERALD; MURPHY; FLAUS *et al.*, 2006; JENUWEIN; ALLIS, 2001). Tais modificações pós-traducionais são capazes de afetar a função dos cromossomos devido a

alterações na carga eletrostática das histonas, provocando mudanças em sua estrutura e interação com a molécula de DNA (JENUWEIN; ALLIS, 2001; MANOHAR; MOONEY; NORTH; NAKKULA *et al.*, 2009). Dessa forma, as histonas representam um importante fator de controle transcricional, tendo os processos de acetilação como um fator crucial para a ativação ou repressão da transcrição gênica. As enzimas histonas acetil-transferases (HAT) e as histonas desacetilases (HDAC) estão envolvidas na regulação dos níveis de acetilação e consequentemente na regulação da transcrição gênica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

Sirtuínas são enzimas desacetilases que respondem às mudanças celulares dos níveis de NAD⁺ e da razão NAD⁺/NADH (IMAI; GUARENTE, 2010). As isoformas das sirtuínas têm distribuições distintas entre os tecidos, tendo todos os outros membros da família das sirtuínas expressa no coração (figura 1) (SHI; WANG; STIEREN; TONG, 2005; YU; ZHOU; LIN; FU *et al.*, 2014). A localização subcelular das sirtuínas é central para ditar seus efeitos biológicos. Por exemplo, SIRT1 é exclusivamente nuclear durante embriogênese cardíaca, já no período pós-natal aparece tanto no núcleo como no citoplasma (TANNO; SAKAMOTO; MIURA;

SHIMAMOTO *et al.*, 2007). Por outro lado, a SIRT3 é predominantemente na matriz mitocondrial (LOMBARD; ALT; CHENG; BUNKENBORG *et al.*, 2007; ONYANGO; CELIC; MCCAFFERY; BOEKE *et al.*, 2002), sendo que alguns estudos sugerem que SIRT3 é exclusivamente mitocondrial (CHEUNG; COLE; XIANG; CHEN *et al.*, 2015; COOPER; SPELBRINK, 2008; JING; EMANUELLI; HIRSCHHEY; BOUCHER *et al.*, 2011; SHI; WANG; STIEREN; TONG, 2005).

A SIRT1 tem sido amplamente implicado numa série de processos metabólicos, incluindo metabolismo lipídico, glicolítico e na regulação do peso/adiposidade (IMAI; GUARENTE, 2010; NEMOTO; FERGUSON; FINKEL, 2004). Em condições de restrição alimentar, o aumento intracelular de NAD^+ induz a ativação de SIRT1, levando a alterações no metabolismo energético os quais podem acabar induzindo o processo de degradação proteica com o intuito de reduzir o gasto energético para a manutenção das organelas e ao mesmo tempo ofertando energia para a manutenção das funções vitais das células (KUMA; HATANO; MATSUI; YAMAMOTO *et al.*, 2004; LEE; CAO; MOSTOSLAVSKY; LOMBARD *et al.*, 2008; TAKESHIGE; BABA; TSUBOI; NODA *et al.*, 1992). Em casos de privação alimentar, esses processos são de extrema importância para o coração pois atua protegendo as células cardíacas, onde segundo Hariharan *et al.*, a privação de nutrientes induz a ativação da SIRT1 e mantendo assim a integridade funcional ventricular (HARIHARAN; MAEJIMA; NAKAE; PAIK *et al.*, 2010).

Na biologia cardíaca, a acetilação das histonas é um mediador dos programas de transcrição que estão subjacentes a proliferação de cardiomiócitos (TRIVEDI; ZHU; WANG; JIA *et al.*, 2010), a diferenciação (KOU; LAU; AU; LEUNG *et al.*, 2010; LI; ZHU; TIAN; LIU *et al.*, 2010), e a remodelação cardíaca patológica (BACKS; OLSON, 2006). Estes mecanismos são sensíveis não só a nutrição e dietas, mas há também outros fatores ambientais tais como exercício físico, drogas e outros, que quando presentes nas fases iniciais do desenvolvimento podem causar alterações na transcrição de genes e repercutir a longo prazo em significativas mudanças na expressão fenotípica, podendo estar relacionadas ao aparecimento de doenças crônicas na vida adulta (KEVERNE; CURLEY, 2008; LILLYCROP; BURDGE, 2012).

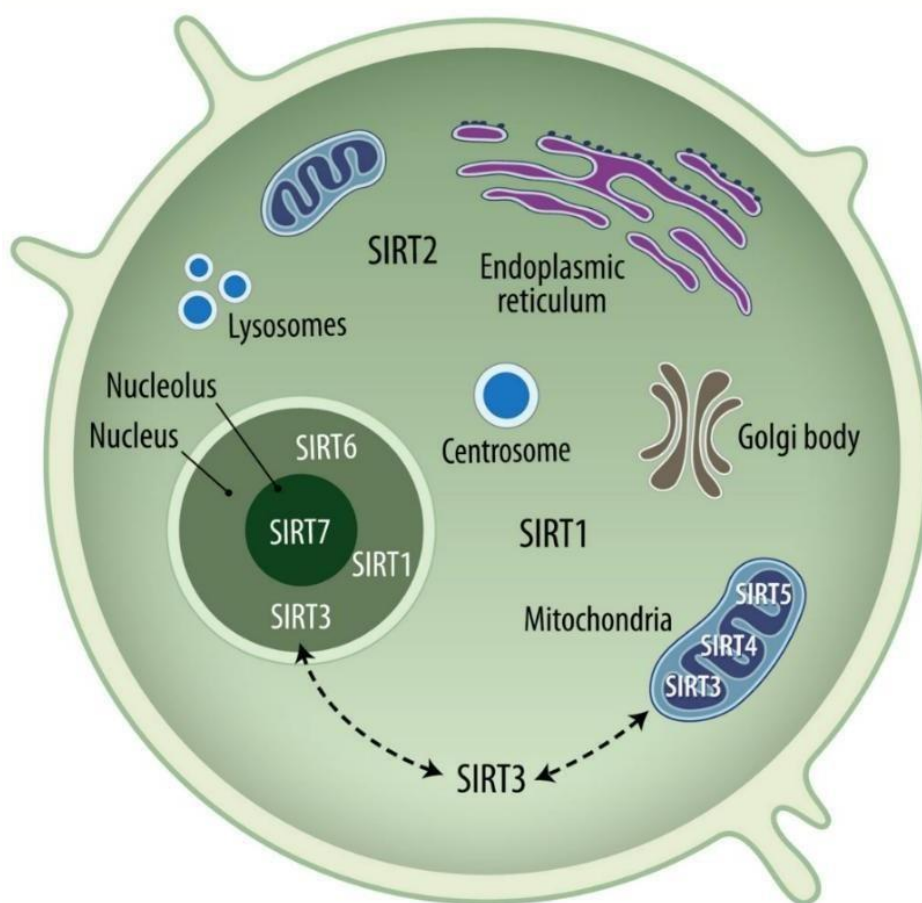


Figura 1 – Localização celular das sirtuínas (fonte: Wei, 2017)

2.4 TECIDO CARDÍACO

2.4.1 Desenvolvimento e plasticidade

O sistema cardiovascular é o primeiro sistema a funcionar durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos, sendo sua formação iniciada logo após a implantação embrionária (DRENCKHAHN, 2009). Em humanos, o coração começa a bombear nutrientes e oxigênio para todo o embrião por volta dos 21 dias após a fecundação (SADLER, 2000) e em roedores por volta dos 8,5 dias (PHOON, 2001; RENTSCHLER; VAIDYA; TAMADDON; DEGENHARDT *et al.*, 2001; SRINIVASAN; BALDWIN; ARISTIZABAL; KWEE *et al.*, 1998). É nesse período que encontra-se a janela de maior vulnerabilidade do tecido cardíaco (SCHOENWOLF; GARCIA-MARTINEZ, 1995), sendo mais sensível a situações adversas, tais como exposição a fármacos e desequilíbrio nutricional. Tal condição exige do organismo

uma reorganização necessária à sobrevivência, a exemplo da diminuição na taxa de divisão celular, com possibilidade de alterar a “plasticidade” da estrutura e função dos sistemas orgânicos ou mesmo a redistribuição de fluxo sanguíneo (BARKER; CLARK, 1997; BYRN; MORDENTI; LUCAS; SMITH *et al.*, 1990; DENNISON; FALL; COOPER; BARKER, 1997; LAVERRIERE; MACNEILL; MUELLER; POELMANN *et al.*, 1994; SCHOENWOLF; GARCIA-MARTINEZ, 1995).

Desenvolvendo-se do mesoderma lateral, o coração surge a partir do crânio do embrião em uma região chamada de “área cardiogênica”, localizada à frente da membrana bucofaríngea (LINASK; LASH, 1988) (figura 2). Esses eventos ocorrem aproximadamente nos dias 19 e 7 pós-concepção em humanos e roedores, respectivamente (SADLER, 2000).

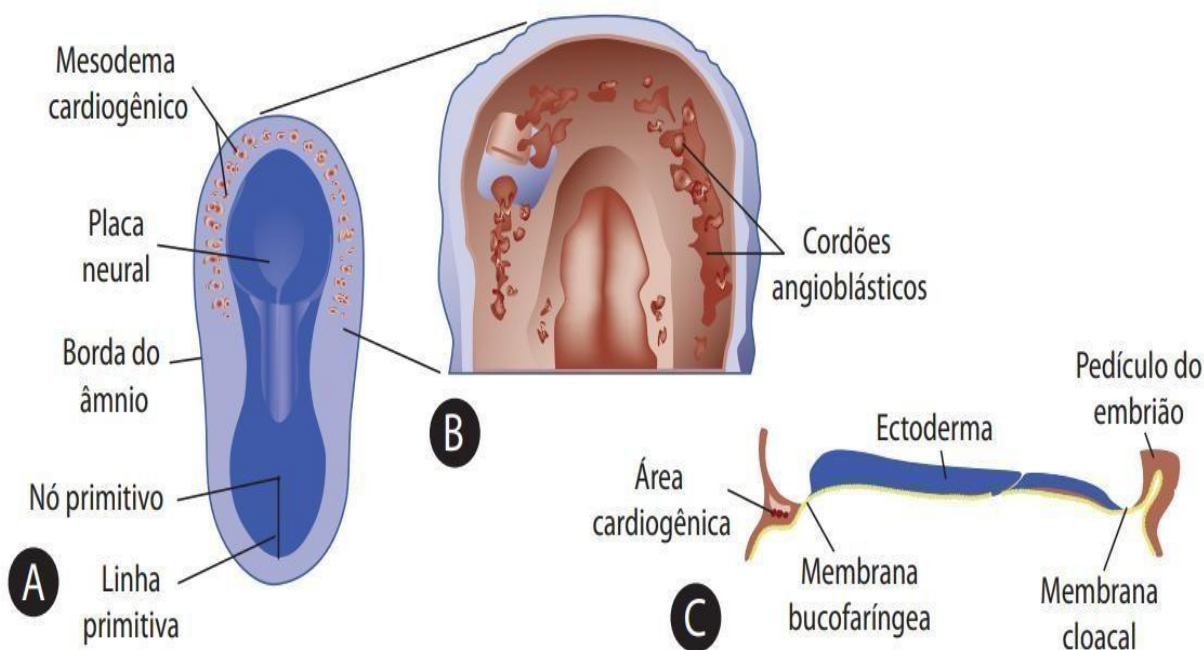


Figura 2 - (A) Vista dorsal do embrião antes dos dobramentos mostrando a área onde se localiza o mesoderma cardiogênico (detalhes em vermelho); (B) detalhe das células do mesoderma cardiogênico formando cordões angioblásticos; (C) corte sagital do embrião mostrando a localização dos cordões angioblásticos à frente da membrana bucofaríngea (fonte: The Cardiovascular System: Embriologia Humana de Evelise Maria Nazari, 2011).

Emergindo da área cardiogênica, formam-se dois fios denominados cordões cardiogênicos, que rapidamente desenvolvem uma estrutura com lúmen conhecida como tubo endocárdico, quando há um dobramento lateral do embrião (SADLER, 2000) (figura 3). Logo em seguida, os dois tubos cardiogênicos fundem-se e formam uma estrutura única e alongada, o tubo cardíaco primitivo, sendo ele dividido no sentido craniocaudal nas seguintes estruturas: tronco arterial (que dará origem a aorta ascendente e ao tronco pulmonar), bulbo cardíaco (que

dará origem ao ventrículo direito), ventrículo primitivo (que dará origem ao ventrículo esquerdo) e átrio primitivo (que dará origem às porções anteriores dos átrios direito e esquerdo) (DERUITER; POELMANN; VANDERPLAS-DE VRIES; MENTINK *et al.*, 1992; MOORMAN; CHRISTOFFELS, 2003; SRIVASTAVA; OLSON, 2000) (figura 2).

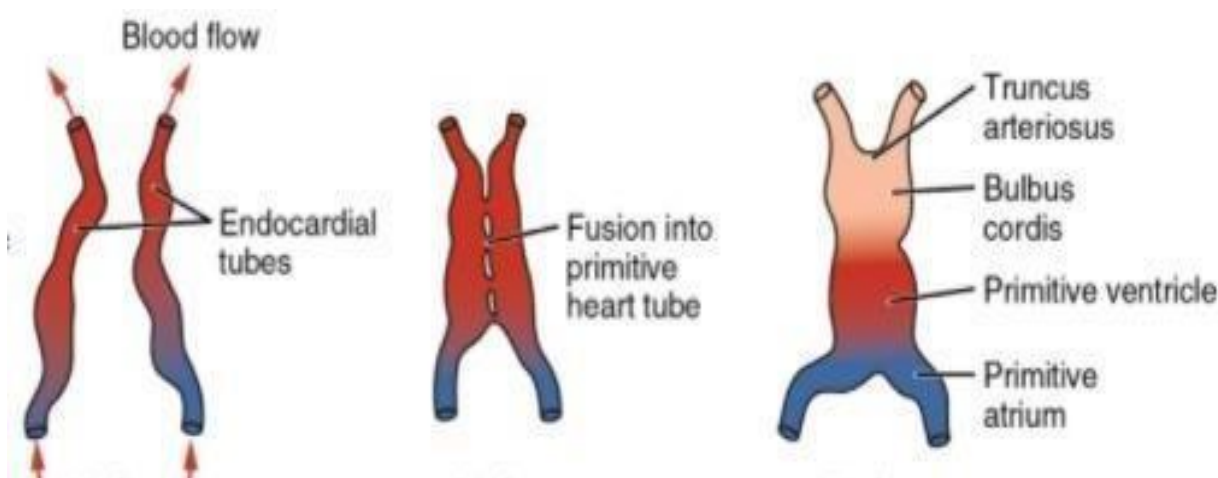


Figura 3 – Formação do tubo cardíaco primitivo (fonte: The Cardiovascular System: The Heart)

Das quatro câmaras cardíacas, o ventrículo esquerdo é o primeiro a desenvolver-se morfológicamente, expandindo-se no segmento ventricular do tubo cardíaco (CHEN; DE DIEGO; CHANG; MCHARG *et al.*, 2010). Nesse estágio, o coração primitivo inicia um processo de dobramento, assumindo sua posição espacial que permanecerá no adulto, todavia sem apresentar septos (MOORMAN; CHRISTOFFELS, 2003), sendo necessária individualização e divisão internas dessas câmaras por um processo denominado “septação do coração”, ocorrendo entre os dias 27 - 37 em humanos e entre os dias 8 - 9,5 em roedores (CHEN; DE DIEGO; CHANG; MCHARG *et al.*, 2010; SADLER, 2000) (Figura 4 – 5).

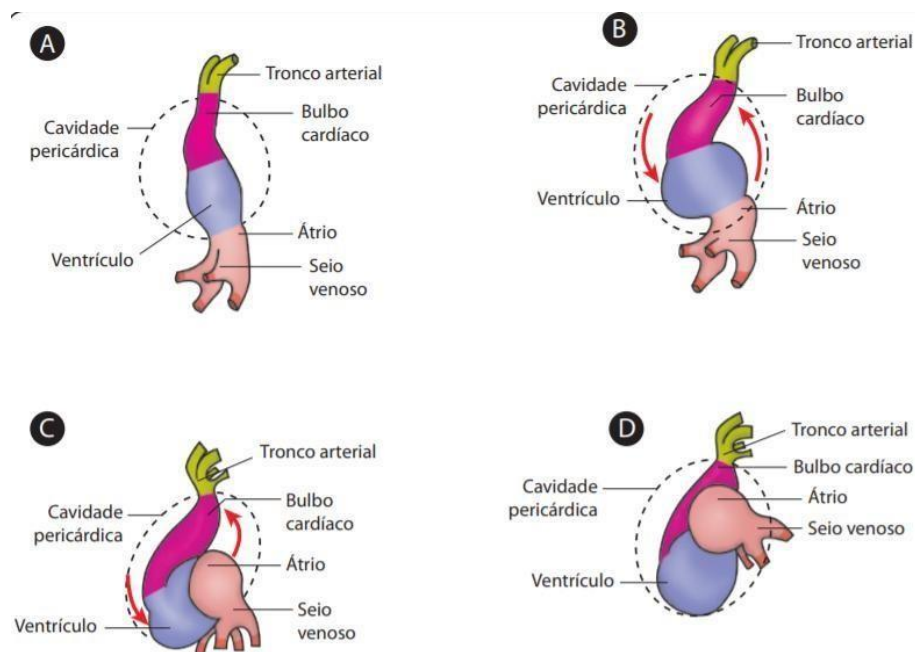


Figura 4 – Esquema do coração primitivo através de uma vista lateral durante o dobramento. (Fonte: www.embryology.ch)

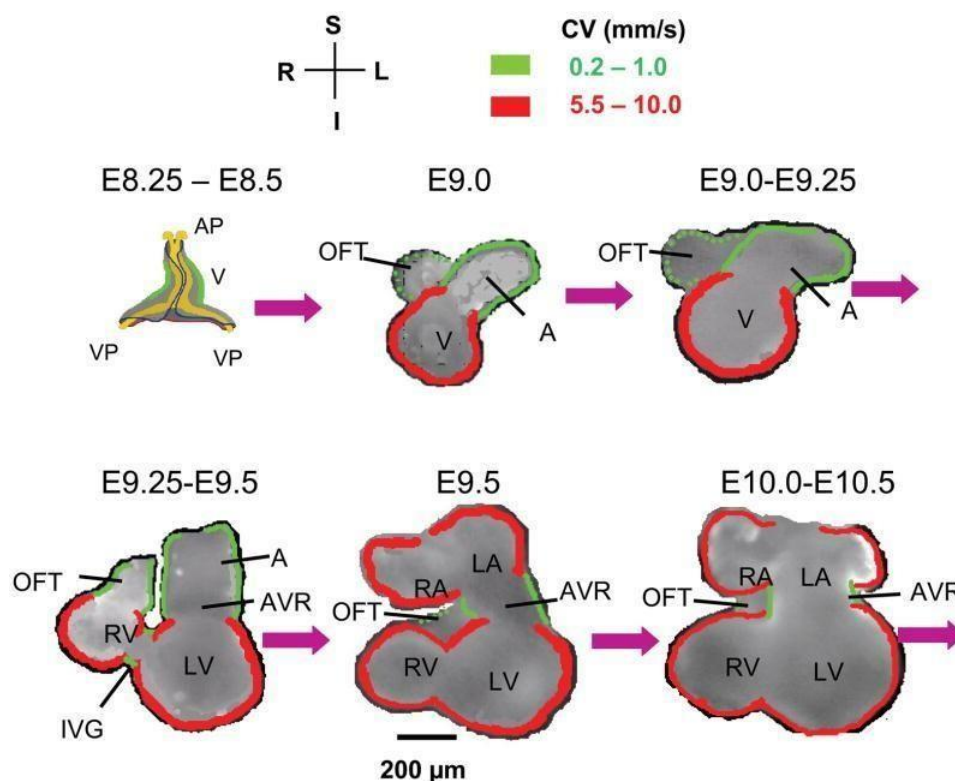


Figura 5 – Ilustração esquemática do desenvolvimento da câmara cardíaca embrionária do crescente cardíaco para o coração de quatro câmaras. (Fonte: Fuhua Dyn, 2011)

Após a septação e formação das válvulas, os dois átrios e os dois ventrículos maduros ainda contêm elementos das câmaras primitivas, bem como zonas de transição, nesse estágio

movimentações peristálticas são observadas no coração (BLOM; GITTENBERGER-DE GROOT; DERUITER; POELMANN *et al.*, 1999). Concomitantemente a esses processos, dar-se-á a formação de células pró-endoteliais isoladas que se fundem em vasos (vasculogênese) e o surgimento da rede de vasos endoteliais existente (angiogênese) (DERUITER; GITTENBERGER-DE GROOT; POELMANN; VANIPEREN *et al.*, 1993). Finalmente, o coração desenvolve seu próprio sistema circulatório para a nutrição e oxigenação do miocárdio, esses eventos são relativamente tardios no desenvolvimento porque só pode acontecer após a cobertura adequada do miocárdio pelo epicárdico (NESBITT; LEMLEY; DAVIS; YOST *et al.*, 2006; VIRAGH; GITTENBERGER-DE GROOT; POELMANN; KALMAN, 1993).

Por fim, as porções atriais e ventriculares começam a trabalhar em conjunto para fornecer o fluxo sanguíneo (de forma unidirecional) adequado para todos os órgãos do corpo afim de atender às necessidades metabólicas em resposta às mediações do meio externo, mantendo, desse modo, o equilíbrio dinâmico do corpo (BUCKINGHAM; MEILHAC; ZAFFRAN, 2005; MOORE; PERSAUD, 2008).

O desenvolvimento cardíaco envolve inúmeras ações coordenadas de células individuais, tecidos e expressão gênica regulada para recrutamento celular, diferenciação e morfogênese rápida desse órgão, essas são características únicas das formas embrionárias e fetais dos cardiomiócitos, capacidade essa inexistente nos adultos (CONWAY; KRUYNSKA-FREJTAG; KNEER; MACHNICKI *et al.*, 2003; LAVERRIERE; MACNEILL; MUELLER; POELMANN *et al.*, 1994; OLSON; SRIVASTAVA, 1996; SRIVASTAVA; OLSON, 2000). Tal potencial proliferativo diminui no final da gestação e se cessa após o nascimento, sendo a hipertrofia das células cardíacas a responsável pelo crescimento e maturação cardíaca pós-natal, no qual saem do ciclo celular e tornam-se binucleados (figura 6) (AHUJA; SDEK; MACLELLAN, 2007; BURRELL; BOYN; KUMARASAMY; HSIEH *et al.*, 2003; LI; WANG; CAPASSO; GERDES, 1996; LINASK; LASH, 1988; MUSUNURU; DOMIAN; CHIEN, 2010). Além da arquitetura intracelular menos organizada, o perfil metabólico encontrado nas células cardíacas neonatais difere de um coração adulto, essas começam a mudar logo após o nascimento. O metabolismo cardíaco precisa ser perfeitamente ajustado para atender as necessidades de seu desenvolvimento e funcionamento (MOZAFFARIAN; KATAN; ASCHERIO; STAMPFER *et al.*, 2006).

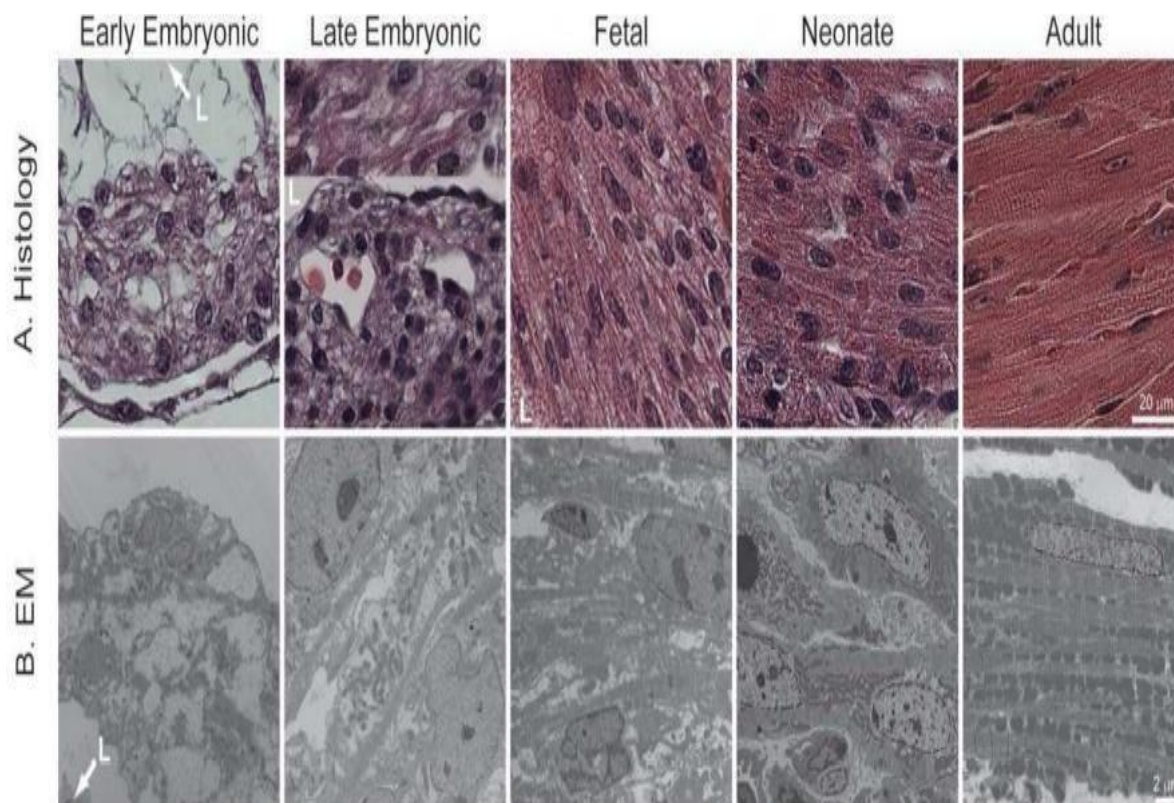
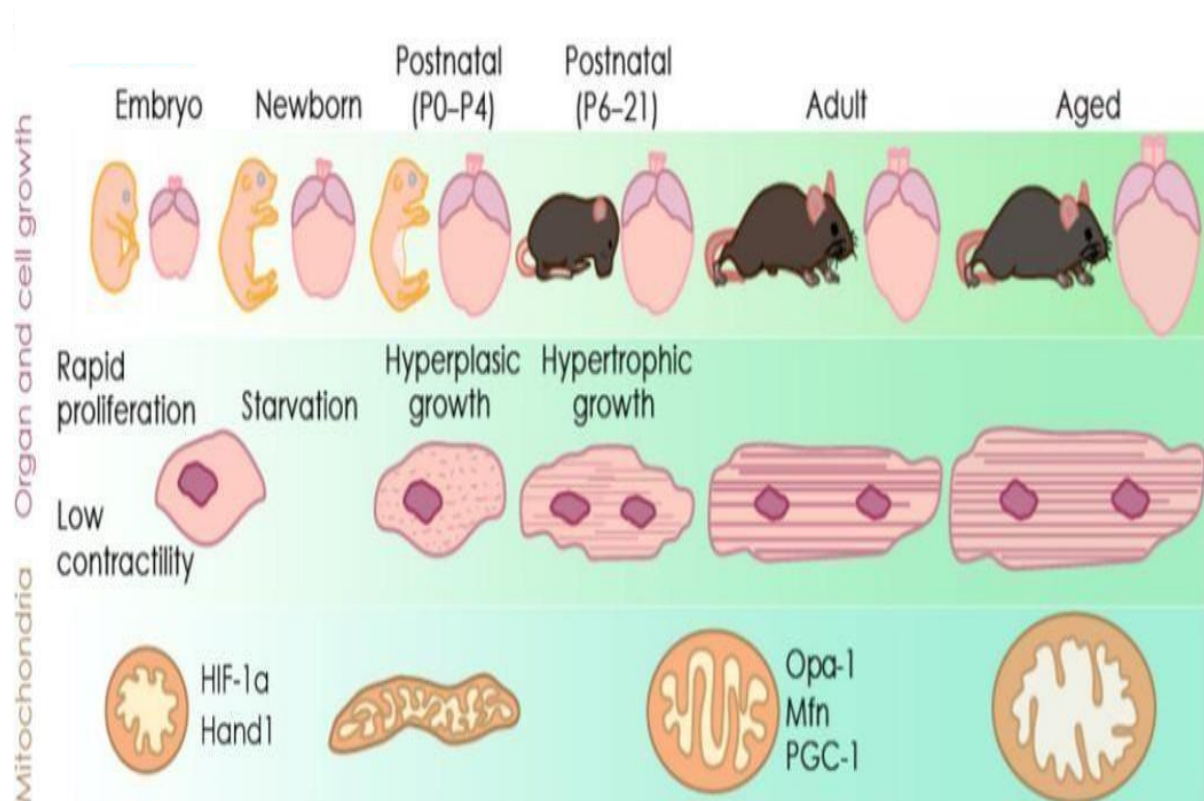


Figura 6 – Histologia do miocárdio durante fases do desenvolvimento (fonte: George Porter, 2011).

2.4.2 Metabolismo cardíaco

O coração fetal realiza sua função em um ambiente com reduzido aporte de oxigênio, essa característica favorece para que a quebra de glicose e oxidação do lactato sejam as principais fontes para a produção de adenosina trifosfato (ATP) para a célula (FISHER; BURGGREN, 2007; PORTER; HOM; HOFFMAN; QUINTANILLA *et al.*, 2011; TIIVEL; KADAYA; KUZNETSOV; KAAMBRE *et al.*, 2000). As maiores reservas de glicogênio e menores quantidades de mitocôndrias também favorecem para esse potencial anaeróbico dos cardiomiócitos fetais (BURTON, 2009; FISCHER; TEN HOVE; SEBAG-MONTEFIORE; WAGNER *et al.*, 2010; LOPASCHUK; JASWAL, 2010). Na medida que os demais órgãos e sistemas desenvolvem-se e maturam-se, aumenta-se a necessidade de nutrientes e oxigênio tanto para o coração, quanto para os demais órgãos, essa exigência induz às células do coração adaptações como ampliação de sua atividade contrátil, mudança no formato e maior demanda energética, essas modificações acontecem desde o período embrionário até a vida adulta (figura 7) (GAO; RAJ, 2010; PIQUEREAU; VENTURA-CLAPIER, 2018).



Trends in Endocrinology & Metabolism

Figura 7 – Mudanças no tecido cardíaco durante fases do desenvolvimento (fonte: George Porter, 2011.).

O coração está entre os órgãos que mais demandam energia no corpo, batendo aproximadamente 100.000 vezes por dia, consome em média de 3,5 a 5 kg de ATP, esse uso excessivo de energia exige um maquinário complexo e eficiente para fornecer a energia que sustenta sua atividade contrátil (NEUBAUER, 2007). Para adquirir a energia que é necessária a cumprir sua função, o coração converte a energia química produzida a partir de diferentes substratos energéticos (carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e corpos cetônicos (figura 8)) em energia mecânica para a interação entre a actina e miosina das miofibrilas, além do uso do oxigênio (GIBB; HILL, 2018). Desta forma, a manutenção do equilíbrio dinâmico do metabolismo cardíaco torna-se essencial para a estrutura fisiológica e melhor continuidade de seu funcionamento (KOLWICZ; OLSON; MARNEY; GARCIA-MENENDEZ *et al.*, 2012).

Em geral, a escolha do substrato energético utilizado pelas células musculares cardíacas depende de alguns fatores: níveis plasmáticos dos substratos e de seus respectivos receptores localizados na membrana plasmática, além da atividade de enzimas que controlam suas vias energéticas (TAEGTMEYER; LAM; DAVOGUSTTO, 2016; TAEGTMEYER; YOUNG; LOPASCHUK; ABEL *et al.*, 2016). Independentemente do substrato utilizado, cada molécula libera a partir de sua degradação, os agentes reduzidos Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

(NADH) e Flavina Andenina Dinucleotídeo (FADH₂) assim como a produção de acetil-coenzima-A (acetil-CoA) que é encaminhada para a via do Ciclo de Krebs para fornecer intermediários (NADH/ FADH₂) que alimentará a cadeia transportadora de elétrons para síntese de novas moléculas de ATP (KOLWICZ; PUROHIT; TIAN, 2013).

No coração adulto, cerca de 70% do acetil- coenzima A (acetil-CoA) provém da β -oxidação dos ácidos graxos, o restante, provém da glicólise (KOLWICZ; PUROHIT; TIAN, 2013). A Glicólise refere-se a uma sequência de 10 reações catalisadas por enzimas livres no citosol celular, na qual uma molécula de glicose é degradada para liberar duas moléculas de ATP, duas moléculas de NAD reduzido (NADH) e duas moléculas de piruvato (PEUHKURINEN; NUUTINEN; PIETILAINEN; HILTUNEN *et al.*, 1982). O piruvato entra na mitocôndria perdendo seu grupo carboxil através do complexo piruvato desidrogenase, que catalisa a formação da acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico, caracterizando dessa forma a oxidação da molécula de glicose (PEUHKURINEN; HASSINEN, 1982). O coração armazena glicose como glicogênio para ser usado durante o aumento da demanda metabólica, uma vez que a utilização da glicose é 20-30% mais rápida que a oxidação de ácidos graxos livres na produção ATP (NEELY; MORGAN, 1974).

Por outro lado, a degradação dos ácidos graxos é a via metabólica predominante do tecido cardíaco para a produção de energia (variando de 40 a 70%) (figura 8), via essa conhecida como β -oxidação (BING; SIEGEL; UNGAR; GILBERT, 1954; LOPASCHUK; BELKE; GAMBLE; ITOI *et al.*, 1994). A β -oxidação no tecido cardíaco ocorre principalmente dos ácidos graxos plasmáticos ligados à albumina (liberados a partir da quebra dos triglicerídeos) ou dos contidos nos quilomícrons ou nas lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), que são absorvidos através de difusão facilitada ou pelos transportadores CD36 e FABP. No compartimento citológico do miócito, para que sejam então degradados, os ácidos graxos são esterificados em acil-CoA, transferem seu grupo acil para a carnitina via carnitina-palmitoil transferase I (CPT-I), entram na mitocôndria onde são convertidos de volta a acil-CoA através da ação da carnitina-palmitoil transferase II (CPT-II) para enfim serem degradados (figura 9) (HOPPEL; KERNER; TURKALY; TURKALY *et al.*, 1998; MCGARRY; BROWN, 1997; PEPINO; KUDA; SAMOVSKI; ABUMRAD, 2014; TOMEK; HOPPEL, 1975). Essa degradação ocorre pela remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos pela ação coordenada das enzimas: Acil-CoA Graxo Desidrogenase; Enoil-CoA Hidratase; β -hirdroxiacil-CoA-desidrogenase (β -HAD); e Acil-CoA-Aciltransferase (Tiolase). Além do encurtamento da cadeia na porção acila do ácido graxo, cada ciclo de oxidação resulta na produção de uma molécula de acetil-CoA, uma de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

(NADH), e uma de Flavina Andenina Dinucleotídeo (FADH₂) (GRYNBERG; DEMAISON, 1996).

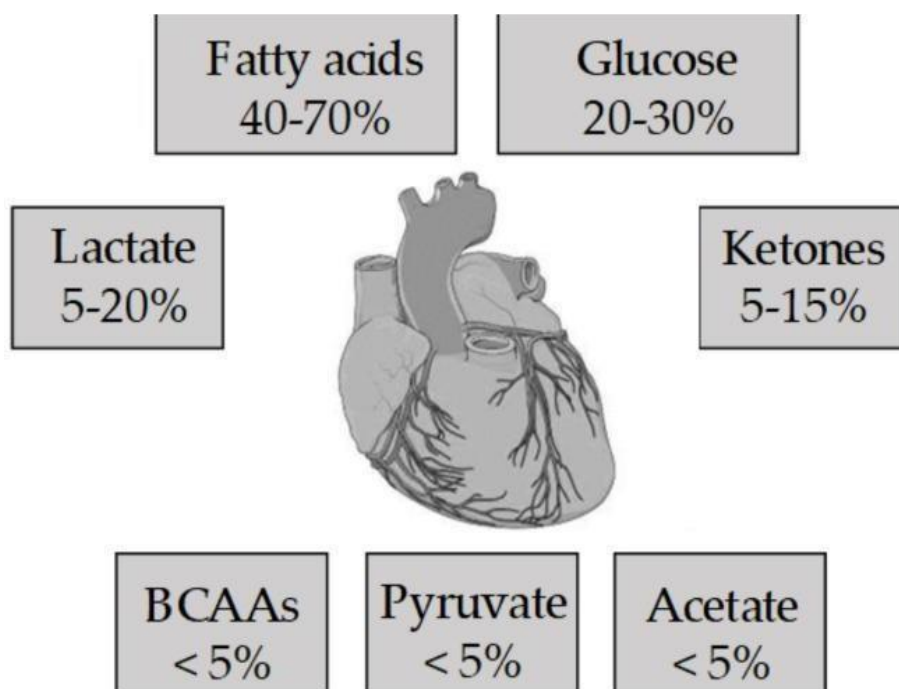


Figura 8 – Porcentagem dos substratos metabólicos utilizados pelas células cardíacas para a produção de energia (fonte: Teresa Pasqua, 2021).

A β -oxidação dos ácidos graxos é dependente de alguns fatores para seu funcionamento, incluindo: a) o fornecimento adequado de ácidos graxos para o coração; b) a presença de substratos energéticos “competidores” (glicose, lactato, aminoácidos, por exemplo); c) suprimento de oxigênio para o coração; d) a demanda energética cardíaca; e por fim, e) o controle da função mitocondrial sobre a atividade do ciclo de Krebs e Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) (figura 8) (LOPASCHUK; BELKE; GAMBLE; ITOI *et al.*, 1994).

As mitocôndrias são organelas presentes em quase todas as células eucarióticas, são responsáveis pela conversão de energia a partir das reações de óxido-redução para a forma de energia química necessária aos eventos celulares, seu nome é derivado do grego “mito = filamento” e “chondros = grão” (HOM; SHEU, 2009). Além de desempenharem um papel crítico no metabolismo celular, as mitocôndrias são responsáveis pela homeostase intracelular do cálcio, ativação apoptótica e morte celular, são fontes de espécies reativas de oxigênio assim como fonte da síntese de fosfolípidos e proteínas (DUCHEN, 1999; 2000; HEVLER; ZENEZENI CHIOZZI; CABRERA-OREFICE; BRANDT *et al.*, 2021; SUSIN; LORENZO; ZAMZAMI; MARZO *et al.*, 1999).

Do ponto de vista anatômico-bioquímico, as mitocôndrias são compostas por duas membranas plasmáticas, um espaço intermembrana e uma matriz (figura 10). A membrana externa possui canais bem regulados que são relativamente permeáveis a muitos íons e compostos metabólicos (MANNELLA, 2006; SHOSHAN-BARMATZ; ISRAELSON; BRDICZKA; SHEU, 2006). A membrana mitocondrial interna é invaginada, criando estruturas de cristas que formam micro domínios de íons, moléculas, nutrientes, ATP, ADP e pequenas proteínas solúveis (MANNELLA, 2006). A membrana interna contém as proteínas que compõem a cadeia respiratória para a geração de ATP e transportadores que são importantes para a entrada e saída de moléculas da matriz. Os locais de contato, onde as membranas mitocondriais interna e externa se encontram, é onde complexos como o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC), creatina quinase mitocondrial e as translocases de nucleotídeo de adenina (ANT) podem ser encontradas, esses locais de contato também são propostos como os locais de fusão e fissão mitocondrial (BRDICZKA; ZOROV; SHEU, 2006; REICHERT; NEUPERT, 2002).

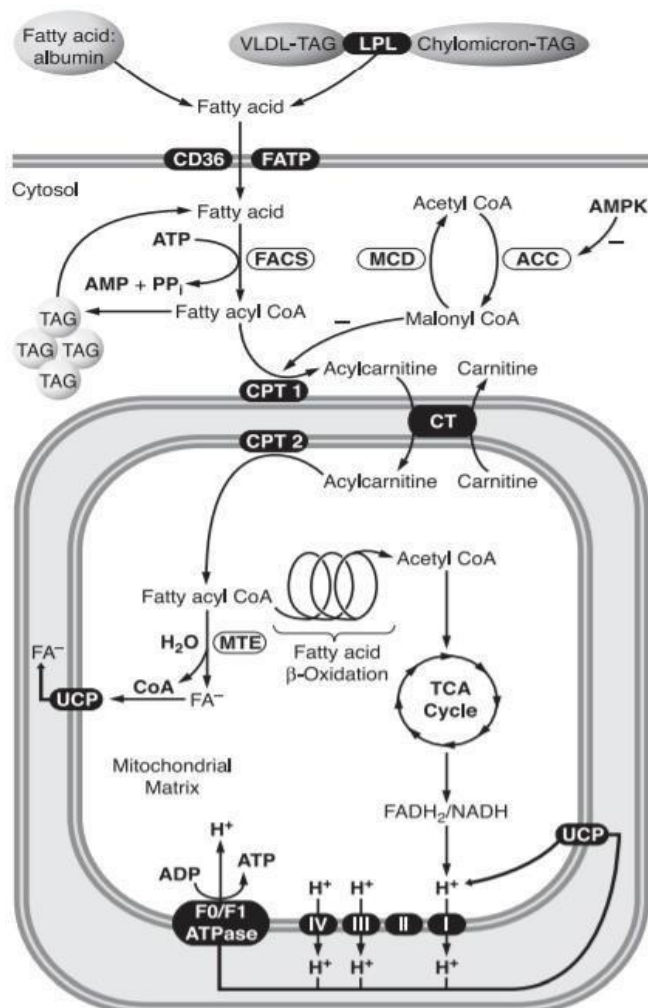


Figura 9 – Resumo da β-oxidação no miócito (fonte: Gary 2010).

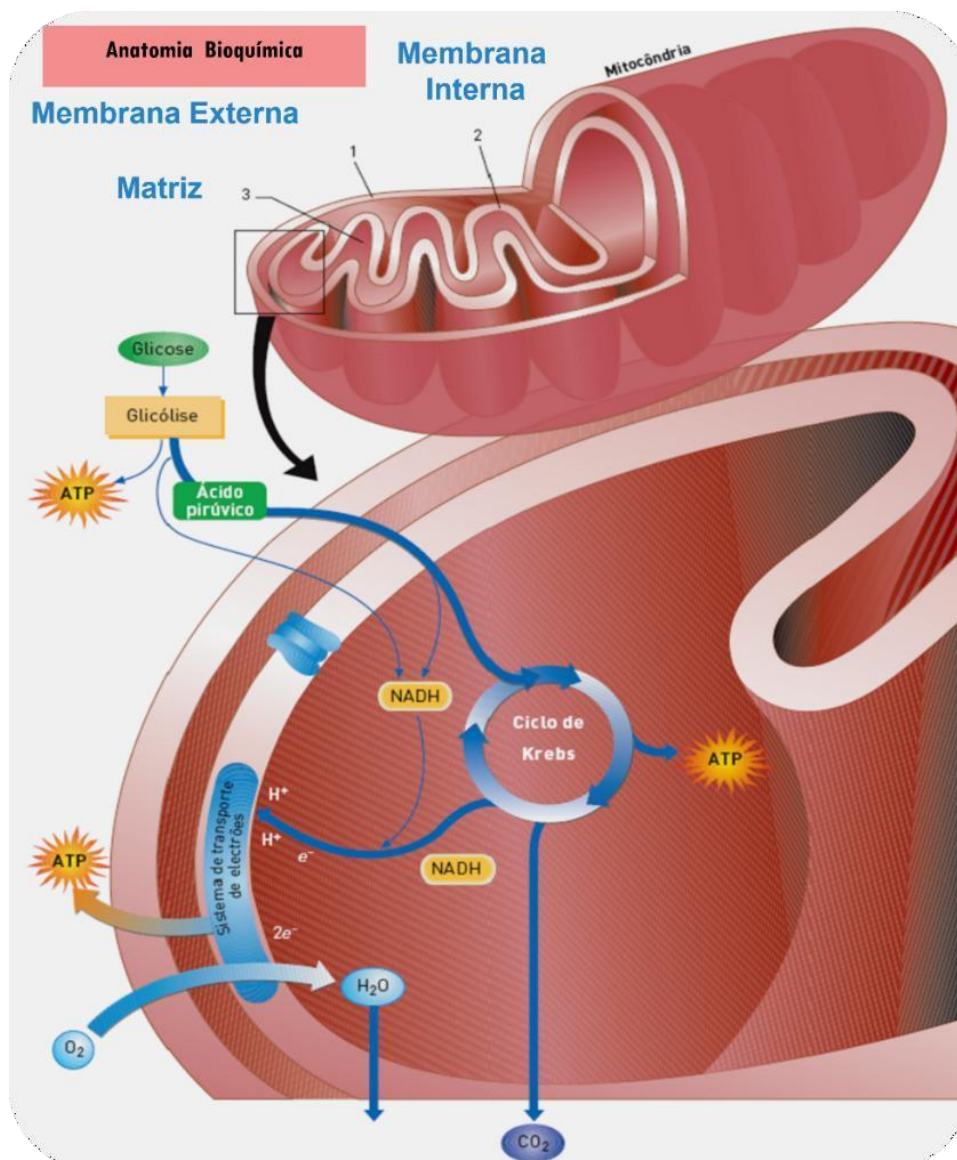


Figura 10 – Anatomia bioquímica da mitocôndria (fonte: NELSON e COX, 2014)

As mitocôndrias são compostas por maquinário enzimático usado para completar a oxidação dos substratos energéticos para produzir ATP. Como mencionado anteriormente, os substratos são catabolizados a acetil-CoA, sendo este o primeiro dos três processos até a formação da energia (figura 11) (BASTIN, 2014; MAECHLER; CAROBBIO; RUBI, 2006). As moléculas de acetil-CoA são direcionadas para o ciclo de Krebs, esse ciclo é uma via catabólica central e praticamente universal. Por ação da enzima citrato sintase, o grupo acetil de dois carbonos acetil-CoA é transferido para o oxaloacetato de quatro carbonos, formando o primeiro produto do ciclo, o citrato (BLOMSTRAND; RADEGRAN; SALTIN, 1997; LARSEN; NIELSEN; HANSEN; NIELSEN *et al.*, 2012). Em uma série de sete etapas enzimáticas consecutivas, o citrato é oxidado de volta à oxaloacetato. O excesso de carbono

produzido no ciclo resulta em duas moléculas de dióxido de carbono. Por outro lado, os elétrons são removidos no processo por transferência aos cofatores reduzidos NADH e FADH₂, sendo esses dois últimos encaminhados à cadeia transportadora de elétrons, doando respectivamente seus elétrons ao Complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) e Complexo II (succinato-desidrogenase) (HOM; SHEU, 2009).

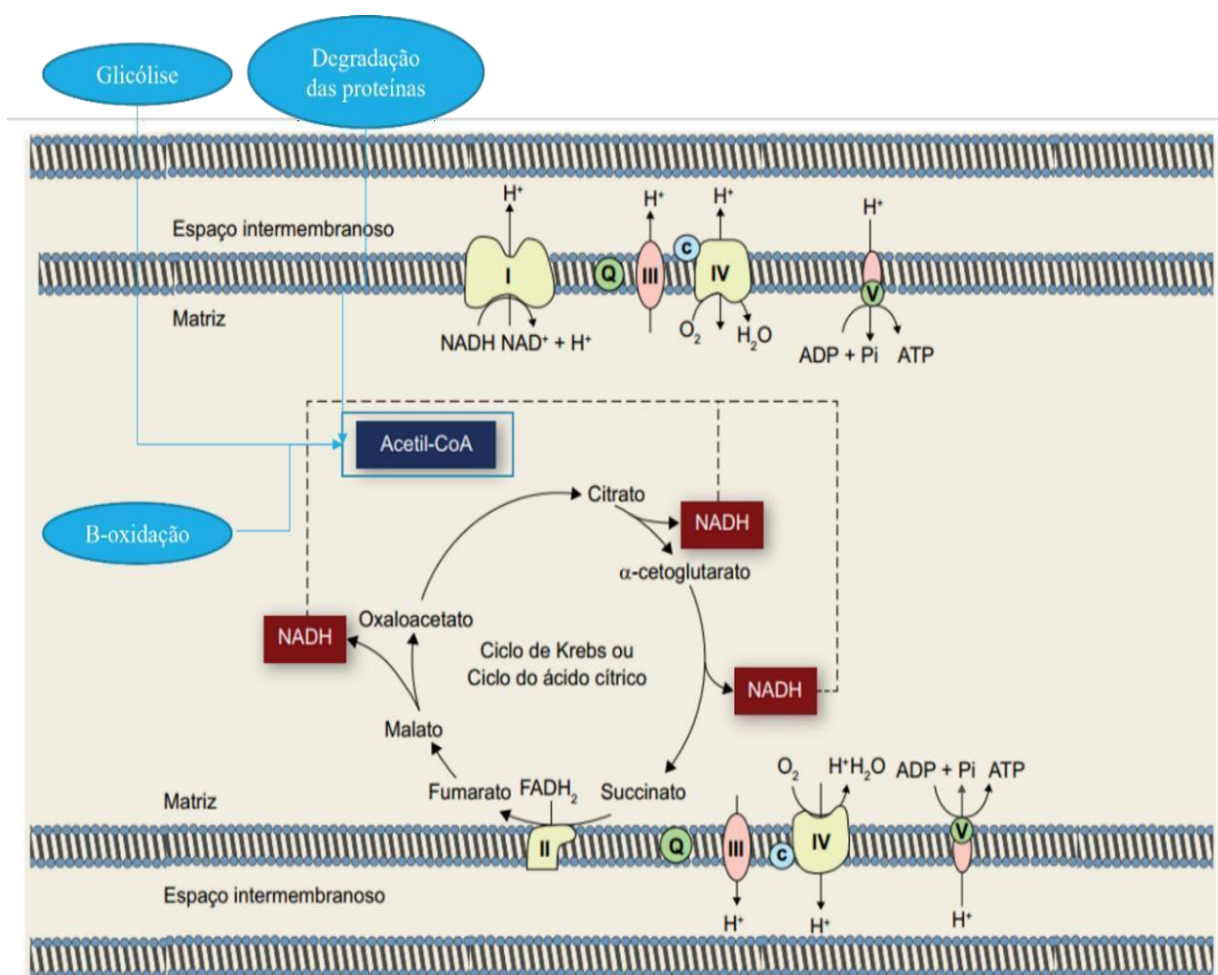


Figura11 – Formação de Acetil-CoA a partir dos substratos energéticos (fonte: adaptado de Fisiologia da Nutrição, 2013).

A cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória, consiste de cinco complexos enzimáticos e duas coenzimas (ubiquinona (CoQ) e citocromo c), esse maquinário está localizado na membrana mitocondrial interna (figura 12) (GUO; ZONG; WU; GU *et al.*, 2017; IWATA; LEE; OKADA; LEE *et al.*, 1998; ZHAO; JIANG; ZHANG; YU, 2019). Por meio de uma série de reações de transferência de elétrons entre os complexos, a mitocôndria utiliza a cadeia transportadora de elétrons para formar ATP, processo esse conhecido como fosforilação oxidativa (GUO; ZONG; WU; GU *et al.*, 2017).

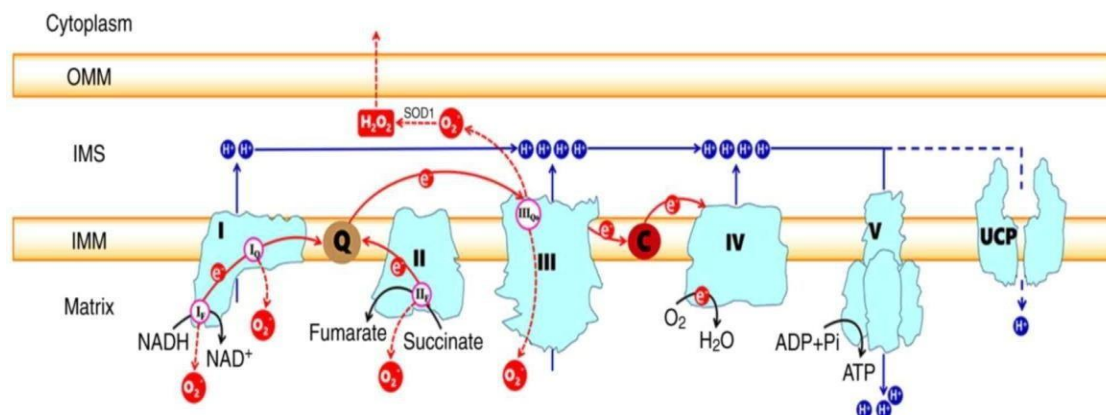


Figura 12 – Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (fonte: ZHAO, 2019).

A fosforilação oxidativa tem início com a transferência dos elétrons do NADH para o e o Complexo I e FADH_2 ao Complexo II. Os elétrons (dois) transferidos para o Complexo I são passados para a ubiquinona (CoQ) através de uma cadeia de cofatores, incluindo um mononucleotídeo de flavina (FMN) seguido por sete aglomerados de baixo a alto potencial ferro-enzofre (FeS). Os elétrons transferidos a partir do Complexo II (dois elétrons, um por vez) também são doados para a ubiquinona. Em ambas as reações, ubiquinona (Q) é reduzida a Ubiquinol (QH_2), sendo essa molécula oxidada pelo Complexo III (citocromo c oxidoreductase), permitindo que um elétron de cada vez continue sua jornada através do citocromo c (ZHAO; JIANG; ZHANG; YU, 2019). O citocromo c é responsável por conduzir os elétrons do Complexo III ao Complexo IV (citocromo c oxidase), onde o oxigênio molecular atua como um aceptor terminal de quatro elétrons sendo reduzido a água H_2O (AHMAD; WOLBERG; KAHWAJI, 2021).

Em resposta ao transporte de elétrons, um total de dez prótons (H^+) (dois do Complexo III e quatro de cada dos Complexos I e IV) são bombeados da matriz para o espaço intermembrana, onde se acumulam para gerar um gradiente de prótons eletroquímico conhecido como potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). O $\Delta\Psi$ combinado com a concentração de prótons (pH) gera uma força protonmotriz (Δp) que é um componente essencial no processo de armazenamento de energia durante a fosforilação oxidativa, uma vez que acopla o transporte de elétrons (dos complexos I-IV) (e consumo de oxigênio no Complexo IV) à atividade do Complexo V (ATP-sintase), onde os prótons retornam à matriz mitocondrial para dissipar o gradiente de prótons. O Complexo V é um complexo de múltiplas subunidades composto por dois domínios distintos, um extra-membranoso (denominado F1) e um transmembrana

(denominado FO), seu funcionamento se dá por meio de um mecanismo de motor rotacional que permite a produção de ATP durante a volta dos prótons para a matriz mitocondrial. O movimento do próton através do FO do espaço intermembrana é acoplado à rotação que resulta na adição de um fosfato a difosfato de adenosina (ADP) para sintetizar trifosfato de adenosina (ATP) nos locais em F₁ (figura 13) (ZHAO; JIANG; ZHANG; YU, 2019). Em contraste à respiração, há o desacoplamento mitocondrial, que ocorre devido à passagem de prótons pelas proteínas desacopladoras (UCP's) ao invés do Complexo V, dissipando o potencial de membrana e produzindo calor (TERADA, 1990).

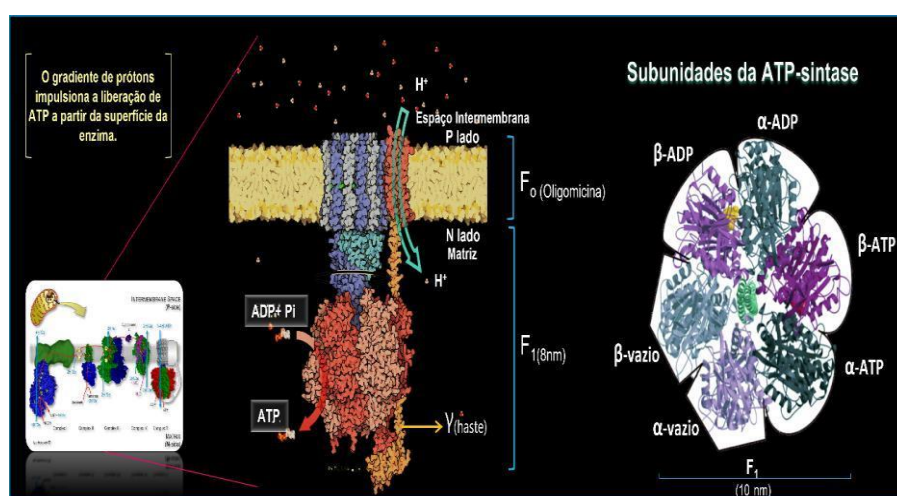


Figura 13– Anatomia do Complexo V (fonte: adaptado de Correia, 2019).

É fundamental o adequado funcionamento dessas vias para que ocorra a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção energética necessária para a célula (NEELY; MORGAN, 1974). Alterações no metabolismo energético cardíaco são importantes contribuintes para a alta incidência e gravidade das doenças cardíacas no mundo. Essas alterações podem incluir um comprometimento da produção de ATP necessário para atender às altas demandas de energia do coração, bem como mudanças adversas na preferência do substrato de energia pelo coração. Com relação a este último ponto, as evidências sugerem que uma diminuição na eficiência cardíaca, causada por um aumento na oxidação de ácidos graxos cardíacos e / ou um aumento no desacoplamento da glicólise da oxidação de glicose, prejudica a função cardíaca e é um fator contribuinte para doenças cardíacas (KINDO; GERELLI; BOUITBIR; CHARLES *et al.*, 2012).

O desacoplamento mitocondrial pode ocorrer também a partir do vazamento de elétrons dos Complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons, que por sua vez reagem de forma monovalente com o oxigênio, resultando na produção do ânion superóxido (figuras 11 e 13)

(HALLIWELL, 2007; JASTROCH; DIVAKARUNI; MOOKERJEE; TREBERG *et al.*, 2010). Esse extravasamento está relacionado a outro mecanismo estabelecido pela literatura envolvendo a mitocôndria e doenças cardiovasculares: o estresse oxidativo mitocondrial. O estresse oxidativo é uma condição celular decorrente de um desequilíbrio entre o sistema oxidante e os sistemas de defesas antioxidantes, com predomínio dos agentes oxidantes em detrimento da atividade antioxidante enzimática e não enzimática (figura 14) (HALLIWELL, 2007). Esse processo pode ser induzido por inúmeras condições, incluindo exposição a agentes químicos, desequilíbrios nutricionais dentre outros (CAPPELLI; ZOPPI; SILVEIRA; BATISTA *et al.*, 2018; CHICO; RICCI; COSCI; SIMONCINI *et al.*, 2017; DA SILVA BARRETO; DE MELO TAROUÇO; DE GODOI; GEIHS *et al.*, 2018; ERASLAN; KANBUR; KARABACAK; ARSLAN *et al.*, 2017; RUDARLI NALCAKAN; NALCAKAN; VAR; TANELI *et al.*, 2011).

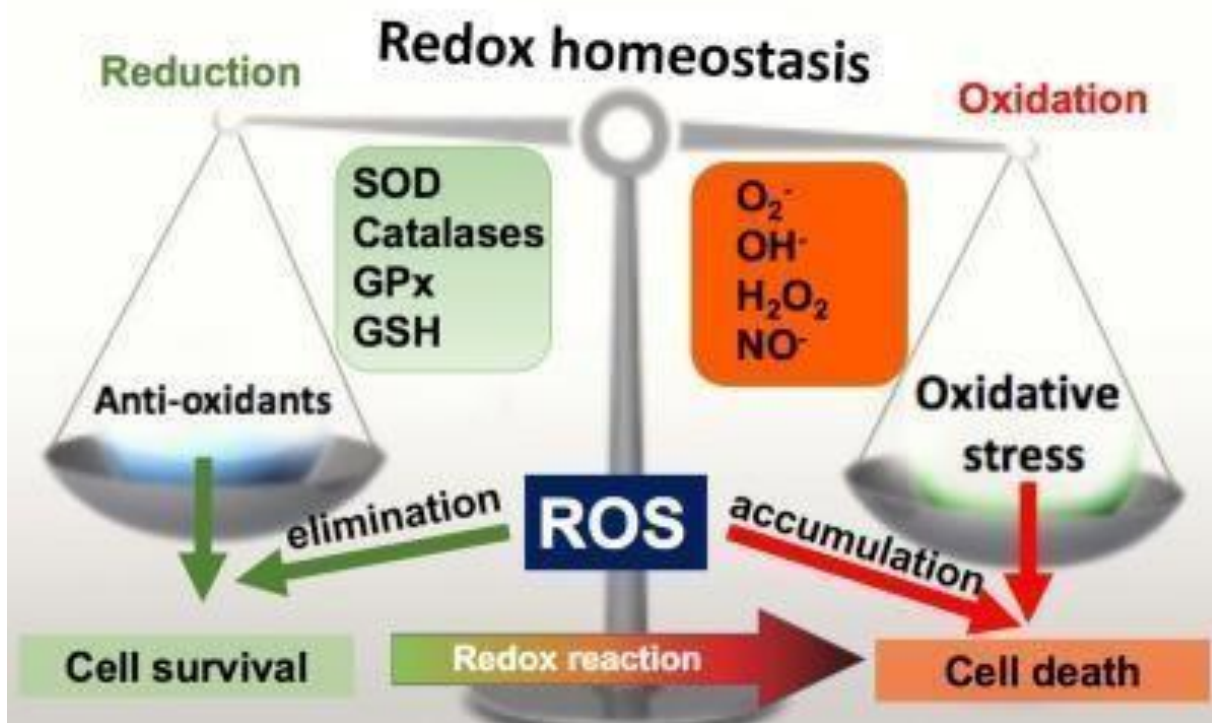


Figura 14 – Representação esquemática do estresse oxidativo (fonte: Zhang, 2021).

O estresse oxidativo pode resultar em danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos e está envolvido em diversos processos patológicos, como por exemplo, o desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, Alzheimer, entre outros (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016; KATTOOR; POTHINENI; PALAGIRI; MEHTA, 2017; STORZ, 2005; ZHAO; LIU; LIU; TANG *et al.*, 2017). Alterações estruturais e funcionais do coração estão intimamente ligadas

ao aumento do estresse oxidativo (DAEHN; CASALENA; ZHANG; SHI *et al.*, 2014; FLEMMING; GALLO; FORBES, 2018; NATIONAL KIDNEY, 2012; RUGGIERO; EHRENSHAFT; CLELAND; STADLER, 2011; TURI; NEMETH; TORKOS; SAGHY *et al.*, 1997; WHALEY-CONNELL; CHOWDHURY; HAYDEN; STUMP *et al.*, 2006).

Entretanto, em condições fisiológicas as espécies reativas de oxigênio desempenham importantes papéis na transdução de sinais como segundos mensageiros, além de auxiliar o sistema imunológico combatendo microrganismos (FINKEL, 2011; FORMAN; THOMAS, 1986; RHEE, 2006). Na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, são consumidos cerca de 98% do oxigênio molecular para formar água, as moléculas de oxigênios remanescentes são então reduzidas de forma monovalente para dar origem ao precursor e mediador de todas as reações em cadeia do estresse oxidativo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (FRIDOVICH, 1997).

Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante é responsável por neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio e são divididos em dois tipos, defesa antioxidante enzimática e não enzimática. Na defesa antioxidante enzimática participam principalmente a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST) (figura 13) (HALLIWELL, 2007; LOCATELLI; CANAUD; ECKARDT; STENVINKEL *et al.*, 2003; SUVAKOV; DAMJANOVIC; STEFANOVIC; PEKMEZOVIC *et al.*, 2013). A enzima superóxido dismutase dismuta o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este por sua vez é convertido pela catalase ou glutathione-peroxidase à água e oxigênio (figura 14) (COLAVITTI; FINKEL, 2005; SHEEHAN; MEADE; FOLEY; DOWD, 2001). Diminuição na atividade da superóxido dismutase induz a uma produção excessiva de ânion superóxido, que resulta na formação de outras espécies reativas, incluindo o peroxinitrito e o radical hidroxila, potentes indutores de danos à DNA, proteínas e lipídeos (EVANS; GOLDFINE; MADDUX; GRODSKY, 2002). Foi demonstrado que o radical hidroxila contribui para o desenvolvimento da hipertensão arterial (TEPEL, 2003; WINGEN; FABIAN-BACH; SCHAEFER; MEHLS, 1997). A catalase possui um papel fundamental contra lesão celular e tecidual, sua super expressão torna as células mais resistentes a toxicidade do peróxido de hidrogênio e minimiza lesões miocárdicas na hipertensão (YANG; ROBERTS; SHI; ZHOU *et al.*, 2004; ZHOU; YANG; DAVIS; DOI *et al.*, 2004). A glutathione-S-transferase catalisa a conjugação de glutathione reduzida (GSH) a uma ampla variedade de compostos eletrolíticos endógenos e exógenos, essa conjugação da glutathione leva à eliminação de compostos tóxicos (figura 15) (TOWNSEND; TEW, 2003).

As vitaminas E e C compõem o sistema antioxidante não enzimático, atuando respectivamente, protegendo os lipídeos constituintes da membrana celular e os lipídeos plasmáticos da peroxidação (GIVERTZ; SAWYER; COLUCCI, 2001). Outro componente importante desse sistema são as glutationas reduzidas. Esse composto tiol de baixo peso molecular desempenha um papel chave na proteção das células contra os danos oxidativos e toxicidade dos xenobióticos, além de auxiliar na manutenção do equilíbrio dinâmico REDOX (figura 16) (MEISTER, 1992).

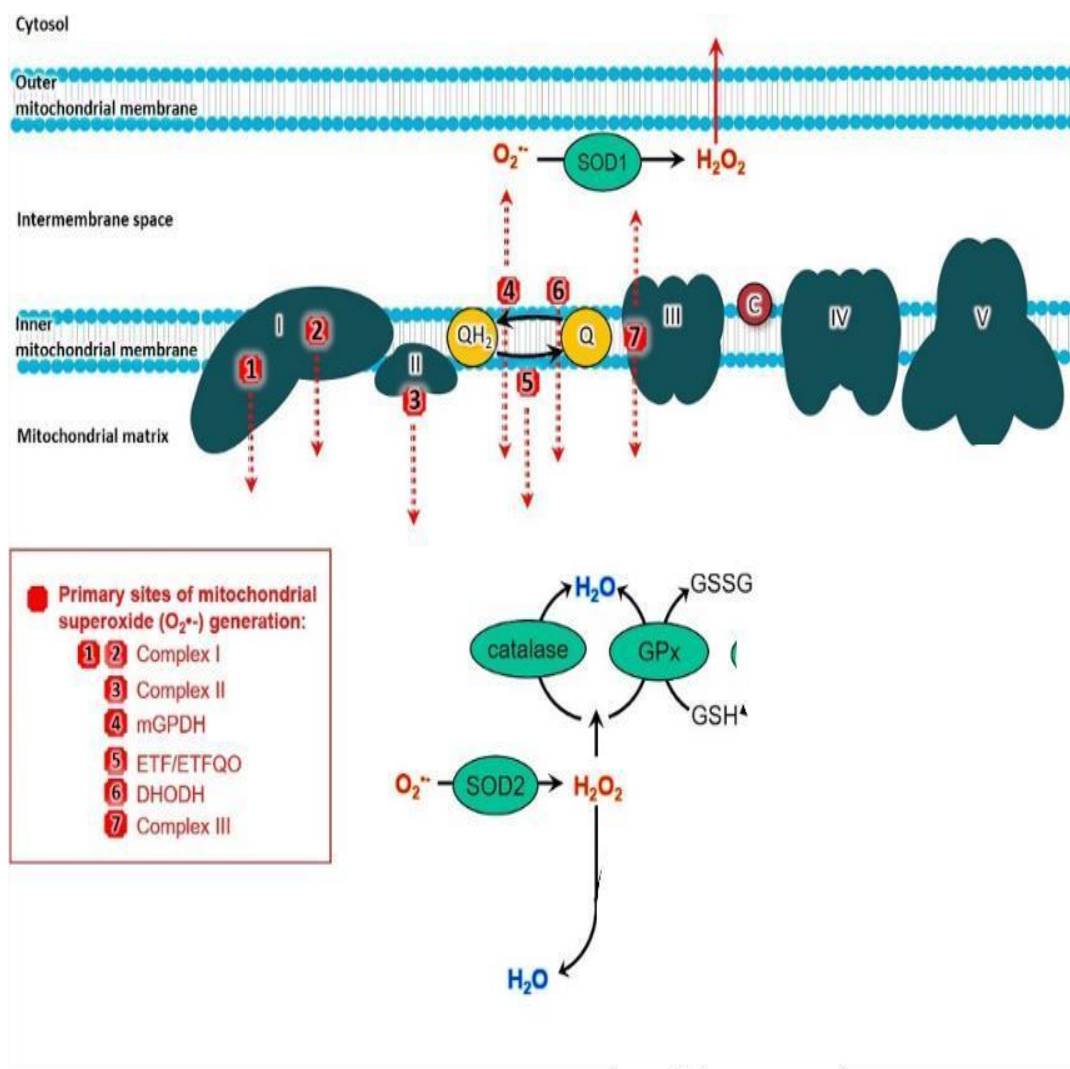


Figura 15 – Produção das espécies reativas mitocondriais e atuação do sistema antioxidante (fonte: Nolfi-Donagan, 2020).

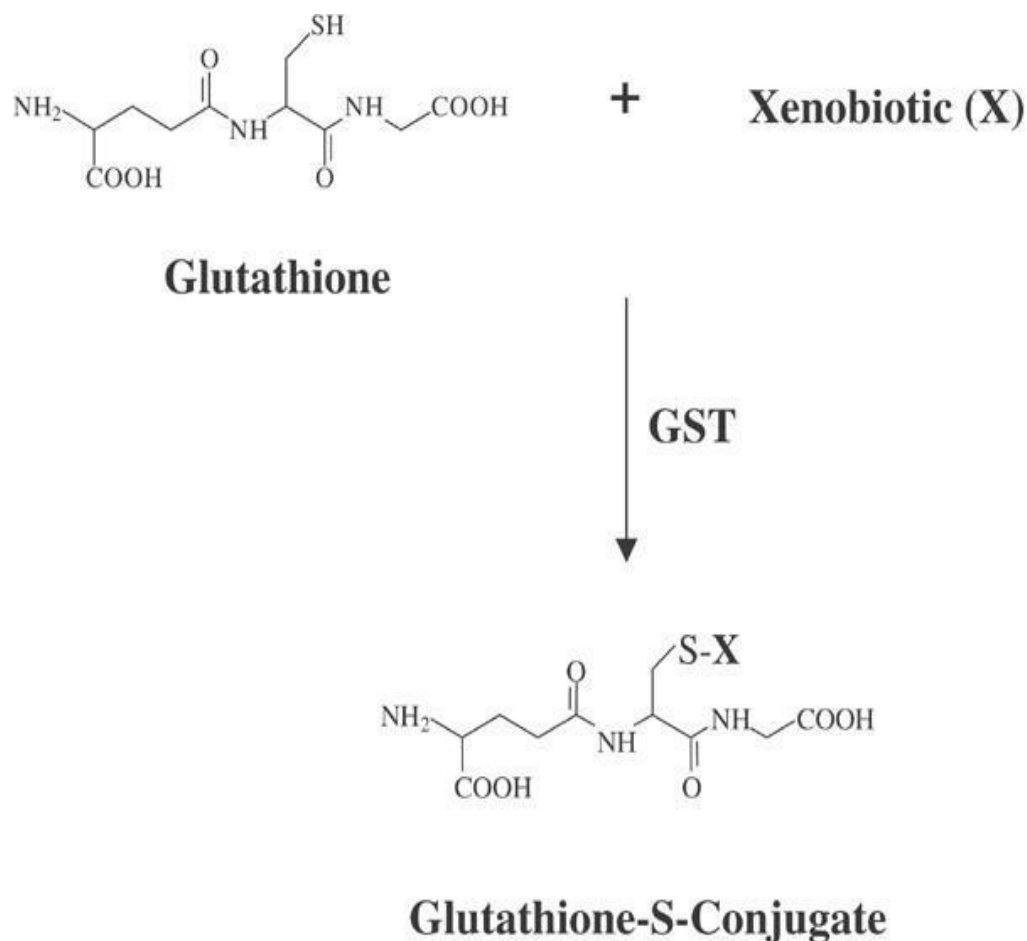


Figura 16 – Reação de enzima da GST de conjugação de uma glutatona a um xenobiótico (fonte: Townsend, 2003).

Dos íons envolvidos no funcionamento das câmaras cardíacas, o cálcio (Ca^{2+}) pode ser considerado um dos mais importantes (JI; SUN, 2004). Desempenhando um papel como segundo mensageiro, atua em vários processos celulares, incluindo contração e metabolismo do miocárdio, diferenciação, migração e secreção celular (BERRIDGE, 2012; BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; LI; DU; SIOW; O *et al.*, 2003; MATHIESEN; CAESAR; THOMSEN; HOOGLAND *et al.*, 2011). A regulação intracelular dos níveis de cálcio é um fator primordial para a manutenção da sobrevivência e função das células, sendo eles mantidos por ação combinada do retículo sarcoplasmático e a mitocôndria (HAJNOCZKY; ROBB-GASPERS; SEITZ; THOMAS, 1995; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003). Em condições fisiológicas, o cálcio mitocondrial regula o metabolismo energético, ao passo que, em altas concentrações, estimula as vias de morte celular mediadas pela mitocôndria.

O papel das mitocôndrias no equilíbrio dinâmico desse íon é importante devido ao seu envolvimento na produção de ATP e porque há um elo entre os níveis mitocondriais de cálcio com o processos de fissão e fusão, e o metabolismo dessa organela (HANSFORD, 1994;

MCCORMACK; HALESTRAP; DENTON, 1990). Através desse controle, as mitocôndrias podem gerenciar dinamicamente alterações transitórias nas concentrações de cálcio e podem tamponar sobrecargas graves de cálcio, que frequentemente estão associadas a condições patológicas (HANSFORD, 1994). Sobrecargas nos níveis de cálcio resultam em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e induz abertura de poros de transição de permeabilidade (PTP), essa abertura compromete a bioenergética e integridade estrutural das mitocôndrias, levando à morte celular (HALESTRAP, 1989; RASOLA; BERNARDI, 2011). Uma resposta morfológica à abertura do poro de transição de permeabilidade de membrana é o inchamento mitocondrial (figura 17), estando ele envolvido na patogênese de muitas doenças associadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares (HALESTRAP, 1989; HALESTRAP; PASDOIS, 2009; RASOLA; BERNARDI, 2011). Entretanto, nem todo inchamento mitocondrial decorre da abertura de PTPM, podendo este ser uma resposta fisiológica momentânea em função de um determinado estímulo (HALESTRAP, 1989; HALESTRAP; PASDOIS, 2009; RASOLA; BERNARDI, 2011).

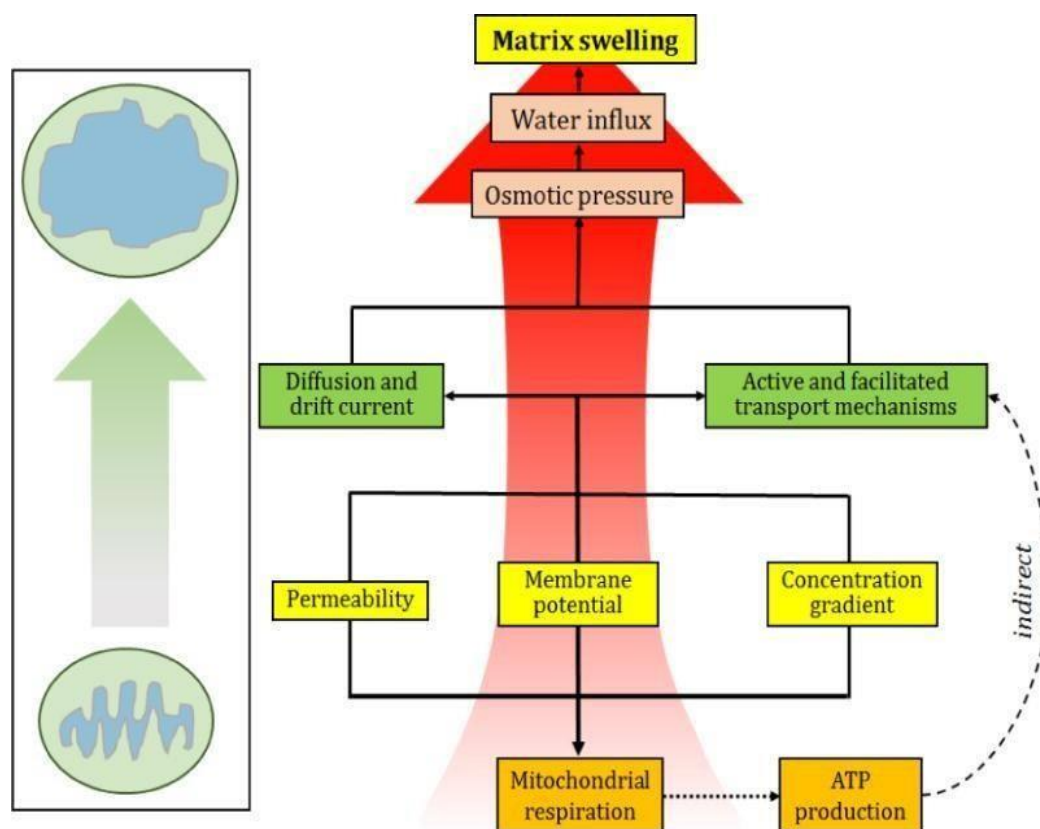


Figura 17 – Esquema representativo do inchamento mitocondrial (fonte: Sabzali Javadov, 2018).

2.5 Exercício físico e suas modulações sobre a saúde cardiovascular

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo, dados da OMS estimam que no ano de 2016 o número de óbitos por doenças cardiovasculares chegou ao valor estonteante de 17,9 milhões, o que representa 31% de todas as mortes em nível global, sendo mais prevalentes em países de baixa e média renda (WHO, 2017). Entre os muitos fatores de risco que predisõem ao desenvolvimento e progressão das patologias cardíacas, o estilo de vida sedentário (caracterizado por níveis baixos de atividade física) é reconhecido como um dos principais contribuintes para danos à saúde cardiovascular. Evidências científicas demonstram a importância da prática regular de atividades físicas e exercício físicos. Estes são associados a inúmeros benefícios, dentre eles se tem a diminuição dos riscos de patologias crônicas degenerativas (diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, entre outras) (ADES; KETELYAN; BALADY; HOUSTON-MILLER *et al.*, 2013; KETELYAN; SQUIRES; ADES; THOMAS, 2014; LINDSTROM; ILANNE-PARIKKA; PELTONEN; AUNOLA *et al.*, 2006; REED; BLAIS; KEAST; PIPE *et al.*, 2017).

No que se refere a atividade física, podemos defini-la como qualquer movimento corporal produzido pela contração musculoesquelética que resulte em gasto energético acima dos valores basais e pode ser categorizada em atividades ocupacionais, esportivas, de condicionamento físico, domésticas dentre outras (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). Por outro lado, quando se aplica à atividade física um planejamento, estruturação e repetição combinado com um objetivo de melhoria e ou manutenção de uma ou mais variáveis da aptidão física (resistência cardiorrespiratória, resistência e força muscular, composição corporal, agilidade equilíbrio, flexibilidade, coordenação, e tempo de reação), esta é denominada de exercício físico (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985; POLLOCK, 1973).

O controle do exercício físico é realizado sobre algumas variáveis: duração, frequência, intensidade e tipo (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, 2009; KRAEMER; ADAMS; CAFARELLI; DUDLEY *et al.*, 2002). Quanto a intensidade, o exercício físico é classificado através da frequência cardíaca máxima (FCM) em: muito leve (<50% da FCM), leve (50-64 da FCM), moderado (65-75 da FCM), intenso (76-96 da FCM) e muito intenso (>96 da FCM) (figura 18) (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, 2009; ZUHL, 2020).

INTENSIDADES DO EXERCÍCIO FÍSICO	NÍVEL	% FcMax
	MUITO LEVE	< 50
	LEVE	50 – 64
	MODERADA	65 – 75
	INTENSO	76 – 96
	MUITO INTENSO	>96

Figura 18 – Classificação do exercício físico quanto a intensidade (fonte: Adaptado de ACMS 2009; ZHUL, 2020)

Em relação aos tipos de exercícios físicos, podemos classificá-los em aeróbios e anaeróbios. Exercício aeróbio utiliza predominantemente o recrutamento das fibras dos grandes grupos musculares (fibras oxidativas: tipo 1), sendo ela mantida de maneira contínua e ritmada, a exemplo do ciclismo, dança, caminhada e corrida de longa duração (PATEL; ALKHAWAM; MADANIEH; SHAH *et al.*, 2017; TALBOT; MAVES, 2016; WAHID; MANEK; NICHOLS; KELLY *et al.*, 2016). O exercício anaeróbio é definido como uma atividade física com característica mais intensa e de curta duração que ativam predominantemente as fibras de contração rápida (fibras glicolíticas : tipos 2X e 2B) (PATEL; ALKHAWAM; MADANIEH; SHAH *et al.*, 2017; TALBOT; MAVES, 2016). Levantamento de peso e o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) são exemplos desse tipo de exercício (GHARBI; DARDOURI; HAJ-SASSI; CHAMARI *et al.*, 2015). Outra diferença bem definida na literatura em relação aos exercícios aeróbio e anaeróbio diz respeito às reações de fornecimento de energia: enquanto as reações metabólicas dos exercícios anaeróbios para gerar ATP ocorrem sem a presença de oxigênio e no citoplasma celular, as reações dos exercícios aeróbios ocorrem dentro das mitocôndrias e com a utilização de oxigênio (POLLOCK, 1973; TALBOT; MAVES, 2016).

Recomenda-se a prática de atividade física e exercício físico desde a infância até a senescência, para cada período é preconizado um tempo mínimo semanal ou diário: crianças em idade pré-escolar (3 a 5 anos) devem ser fisicamente ativas ao longo do dia para aumentar o crescimento e o desenvolvimento; crianças e adolescentes de 6 a 17 anos: 60 minutos ou mais de atividade física moderada a vigorosa diariamente; adultos: de 150 minutos a 300 minutos

por semana de intensidade moderada; idosos: 150 minutos semanais (2010; NAWROCKA; MYNARSKI, 2017).

Treinamento físico é caracterizado como um processo repetitivo e sistemático, composto de exercícios progressivos que visam o aperfeiçoamento do desempenho em seus aspectos morfológicos e funcionais, impactando diretamente sobre a capacidade de execução de tarefas que envolvam demandas motoras, sejam elas esportivas ou não (PIERCY; TROIANO; BALLARD; CARLSON *et al.*, 2018).

Está bem estabelecida a relação da prática de exercícios físicos aeróbicos em intensidade moderada com a prevenção de doenças cardiovasculares. Utilizando ratas adultas da linhagem *Sprague-Dawley*, Wisløff e colaboradores (2002) verificaram uma redução de 15% na hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) pós-infarto, bem como diminuições de 12% comprimento e 20% na largura dos miócitos acompanhados de melhora na contratilidade miocárdica (WISLOFF; LOENNECHEN; CURRIE; SMITH *et al.*, 2002). Os mecanismos associados aos efeitos positivos do treinamento físico em intensidade leve a moderada incluem a modulação do estado REDOX celular e mitocondrial por modular padrões de respiração mitocondrial cardíaca (ASCENSAO; MAGALHAES; SOARES; FERREIRA *et al.*, 2005).

Bello-Klein e colaboradores 2000 investigaram o efeito de um protocolo de 4 semanas de treinamento físico moderado (50% do consumo máximo de oxigênio) em estreia sobre o perfil hemodinâmico, atividades de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo no miocárdio de ratos *Wistar* jovens. Em seus resultados observaram: uma redução de 14% nas pressões arteriais sistólica, diastólica e média além de um aumento de 16% na atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase, sugerindo que físico submáximo em idade precoce reduz a carga hemodinâmica e potencializa o sistema antioxidante (BELLO-KLEIN; LAGRANHA; BOCK, 2000). De forma semelhante, Boveris e Navarro (2008) mostraram que mitocôndrias isoladas de coração de camundongos submetidos ao treinamento físico apresentavam um aumento significativo na atividade do complexo V da cadeia transportadora de elétrons, além de diminuir o conteúdo mitocondrial de peroxidação lipídica e proteica após 24 semanas de treinamento, esses dados sugerem redução importante nos indicadores de estresse oxidativo e melhora da função mitocondrial (BOVERIS; NAVARRO, 2008).

Ferreira *et al.* (2014), realizando um estudo de proteômica e fosfo-proteômica mitocondrial, analisaram os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito benéfico da atividade física na função cardíaca. Os dados revelaram que após 54 semanas de exercício moderado em esteira houve uma modulação nas proteínas totais e na fosforilação de proteínas envolvidas na função mitocondrial, com um aumento na oxidação de carboidratos juntamente

com a modulação de várias quinases que podem alterar a função de proteínas mitocondriais, sugerindo uma plasticidade cardíaca mitocondrial em resposta a programas de exercícios (FERREIRA; VITORINO; PADRAO; ESPADAS *et al.*, 2014).

Além de estar associado à melhoria da capacidade física e ao aumento do metabolismo oxidativo (BRUM, *et al.*, 2004), há número crescente de dados na literatura que apontam modulações nos mecanismos epigenéticos como um dos mecanismos moleculares envolvidos nessas positivas adaptações do exercício físico moderado em relação a saúde cardiovascular (BUTTS; BUTLER; DUNBAR; CORWIN *et al.*, 2018; CARSON; RIDGERS; HOWARD; WINKLER *et al.*, 2013; LEHMANN; JEBESSA; KREUSSER; HORSCH *et al.*, 2018).

Até a época que iniciamos nossos estudos, que deram origem a essa tese, não existia dados na literatura que buscavam avaliar os efeitos do treinamento físico em indivíduos juvenis, que foram submetidos a desnutrição proteica durante períodos críticos do desenvolvimento. Dessa forma, objetivamos avaliar os efeitos separados e combinados, de ambos os desafios desnutrição e treinamento físico moderado, na função mitocondrial, balanço oxidativo e mecanismos epigenéticos no tecido cardíaco.

3 OBJETIVO

3.1. GERAL

Investigar os efeitos do treinamento físico moderado sobre os mecanismos epigenéticos, balanço oxidativo e bioenergética mitocondrial de ventrículo cardíaco de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica materna.

3.2. ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos de 4 semanas de treinamento físico moderado sobre mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de ratos jovens submetidos à restrição proteica materna durante a gestação e lactação sobre:

- Atividade da enzima do ciclo de Krebs, -citrato sintase, no tecido muscular e cardíaco;
- Os níveis de NAD^+/NADH ;
- A velocidade de respiração das mitocôndrias;

- A produção de espécies reativas de oxigênio;
- A capacidade das mitocôndrias de captar cálcio;
- Os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo (Malonaldeído: MDA / Carbonilas);
- Atividade da defesa antioxidante enzimática (Superóxido Dismutase: SOD / Catalase: CAT / Glutathione-S-transferase: GST)
- Níveis da defesa antioxidante não enzimática (quantificação do balanço REDOX – Glutathione Reduzida GSH/ Glutathione Oxidada GSSG, Sulfidrilas)
- A expressão gênica das Sirtuínas 1 e 3 (SIRT 1) (SIRT 3);
- A expressão proteica de Sirtuínas 1 e 3 (SIRT 1) (SIRT 3);
- Os níveis de acetilação da lisina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E DIETA

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas no Centro Acadêmico de Vitoria-UFPE. 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 (número do processo: 0060/2018).

Utilizamos 8 progenitoras (com ninhada de 8 filhotes cada), sendo que, de cada progenitora utilizamos 2 filhotes por ninhada para cada análise experimental. As progenitoras foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%) (Tabela 1). Na lactação, as progenitoras continuaram recebendo dieta conforme o grupo experimental e após o desmame (21 dias de idade), todos os filhotes receberam dieta normo-proteica (Caseína 17%) para suprir todas as necessidades nutricionais durante a fase de crescimento.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	88,0 g	194,0 g
Mix Vitamínico	10,0 g	10,0 g
Mix Mineral	35,0 g	35,0 g
Celulose	50,0 g	50,0 g

Bitartarato de Colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de Soja	76,0 ml	76,0 ml
Amido de Milho	503,486 g	397,486 g
Amido Dextrinizado	132,0 g	132,0 g
Sacarose	100,0 g	100,0 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

*Quantidade para 1 kg de dieta. Descrito por Reeves, (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993)

4.2 PROTOCOLO DE TREINO

Inicialmente, os animais foram submetidos no 26º, 27º e 28º dias de vida a um teste de corrida incremental até a fadiga, onde foi avaliado o desempenho dos animais com a progressão da velocidade em 0,3Km/h a cada 3 minutos (BROOKS; WHITE, 1978). Aos 30 dias de vida, os grupos controle (C) e desnutrido (D) foram subdivididos em Não treinados (C e D) e treinados (CT e DT) sendo então submetidos a um programa de treinamento físico moderado, em esteira ergométrica para ratos (INBRAMED, classe I, tipo B, 9015.5.x) e seguiram o protocolo experimental previamente publicado que consiste em 4 semanas de treino, por 5 dias/semana e 60 min/dia, a 50% da capacidade máxima (BELLO-KLEIN; LAGRANHA; BOCK; BELLO *et al.*, 2000; BRAZ; FERREIRA; PEDROZA; DA SILVA *et al.*, 2015). Ao 6º dia de cada semana de treino, os ratos passaram por um teste de esforço para certificarmos a intensidade e com isso corrigir semanalmente a velocidade de treino para que todos os animais mantivessem a intensidade de 50% da capacidade máxima durante as 4 semanas. O grupo não treinado permaneceu nas gaiolas, no mesmo tempo e ambiente dos animais em treinamento.

4.3 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS

Os animais receberam uma hiperdosagem de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (270mg/kg) seguidos de decaptação em guilhotina, e submetidos à cirurgia para a coleta dos ventrículos.

4.4 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS

As mitocôndrias foram isoladas dos ventrículos 48 horas após a última sessão de exercício, utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial (LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010; NASCIMENTO; FREITAS; SILVA-FILHO; LEITE *et al.*, 2014). Após a remoção, o coração foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES (pH 7,2) e 0,5 mM de EGTA, picado com tesoura e homogeneizado

em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 5 minutos a 12000 rpm. A fração mitocondrial foi ressuspensa em 250 mM de sacarose, 5 mM de HEPES (pH 7,2) isenta de EGTA.

4.5 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se uma curva padrão de 0 a 40 µg/ml de albumina bovina sérica, o reagente de Bradford (coomassie brilliant blue 0,01%, etanol 47%, ácido fosfórico 8,5% e água destilada q.s.p) e a absorbância determinada a 595nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CITRATO SINTASE

A citrato sintase é a primeira enzima no ciclo de Krebs e catalisa a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato para formar citrato (WIEGAND; REMINGTON, 1986). Avaliamos a atividade dessa enzima pois segundo Sachs et al. (2011) a mesma pode ser alvo da SIRT3 tendo sua atividade modulada pelos níveis de acetilação (SACK, 2011). A atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente (BRAZ; PEDROZA; NOGUEIRA; DE VASCONCELOS BARROS *et al.*, 2016; DA SILVA; BRAZ; SILVA-FILHO; PEDROZA *et al.*, 2015; DA SILVA PEDROZA; LOPES; MENDES DA SILVA; BRAZ *et al.*, 2015). 0,3mg/ml foi adicionado a um meio de reação contendo (em mmol / L) 100 de Tris-HCl, 1 de MgCl₂, 1 EDTA, 0,2 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico), 3 acetil-CoA redutase, 5 oxaloacetato e 0,3 mg/mL de homogeneizado, sendo sua atividade avaliada durante 3 min no comprimento de onda de 420nm. Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE NAD⁺ E NADH

Os níveis de NAD⁺ e NADH foram determinados como descrito anteriormente por (Ferreira et al, 2015). Foram incubadas 100µg de amostras de proteínas com um tampão contendo 50 mM-TRIS e 1mM-EDTA (pH 7,4) à temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, a absorbância foi lida em dois comprimentos de onda, 260nm e 340nm, para NAD⁺ e NADH, respectivamente. Os resultados foram expressos como nmol por mg de proteína, em que ambos

os compostos tiveram seus valores comparados às curvas padrão com concentrações conhecidas para cada uma das coenzimas.

4.8 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS COM AS MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados à 28 °C, em meio de reação padrão contendo 120 mM KCl, 5 mM MOPS, 5 mM fosfato de potássio e 0,2% de albumina (pH 7,4). Como substrato respiratório foi utilizada uma mistura de substratos para o complexo I da cadeia respiratória (2mM de malato e 10mM de glutamato). Nos experimentos de consumo de oxigênio também foram utilizados oligomicina (inibidor do complexo V) e CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona, inibidor químico da fosforilação oxidativa causando o desacoplamento do gradiente de prótons). Os experimentos foram feitos na presença de 0,5 mM de EGTA (LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DA VELOCIDADE DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

O consumo de oxigênio por mitocôndrias foi medido polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo Clark conectado a um oxímetro, em uma câmara de vidro fechada e termostatizada (1 mL), equipada com agitador magnético (LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010; NASCIMENTO; FREITAS; SILVA-FILHO; LEITE *et al.*, 2014). Alíquota (0,5mg/ml) de mitocôndria isolada foi adicionada ao tampão de respiração compreendendo 120 mM de KCl, 4 mM HEPES, 5 mM de K₂HPO₄, e 0,2% de albumina de soro bovino (BSA), pH 7,4, com a mistura de substratos para o complexo I (10 mmol·L⁻¹ glutamato 1/2 mmol·L⁻¹ malato 1) e 0,5 mM de ADP para iniciar o processo de fosforilação. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg prot (LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010; NASCIMENTO; FREITAS; SILVA-FILHO; LEITE *et al.*, 2014).

4.10 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS TOTAIS

A produção de espécies reativas totais de mitocôndrias cardíacas isoladas foi medida fluorimetricamente utilizando o marcador 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). 0,1mg de mitocôndrias isoladas foram incubadas com tampão para o complexo 1 seguido

da adição de 1 μ M de H₂DCF-DA. A fluorescência foi monitorada pela excitação de 544 nm e uma emissão de 590 nm, através do espectrofotômetro de fluorescência (FLUOStar, Omega, Allmendgrün Ortenberg, Germany). Os resultados foram expressos em através do nmol/min/mg prot.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE MITOCONDRIAL DE CAPTAÇÃO DE CÁLCIO

Para a medida da capacidade de captação de cálcio foi utilizando o probe fluorescente *Calcium Green-5N* (Molecular Probes, USA), no leitor de fluorescência. O cálcio green é utilizado como um indicador da resistência da abertura do poro de membrana mitocondrial (mPTP) depois da acumulação de Ca²⁺ na matriz. A concentração de Ca²⁺ extra-mitocondrial foi avaliado com 0,5 mmol/L de cálcio green-5N, com comprimentos de onda de excitação e emissão fixado em 506 e 532 nm, respectivamente. Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foram ressuspensas em tampão (150 mmol/L de sacarose, 50 mmol / l de KCl, 2 mmol / L de KH₂PO₄, 20 mmol / L de Tris / HCl, pH 7,4) e substrato de complexo I. No final do período de pré-incubação (300 s), foram adicionados pulsos sucessivos de 10 μ M de Ca²⁺. Quando as mitocôndrias não conseguem mais tamponar o Ca²⁺, o mPTP abre e a concentração de ions cálcio aumenta no meio externo (PARDO; RINALDI; MOSCA, 2015; TANG; LEUNG; HUANG; FELETOU *et al.*, 2007).

4.12 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.12.1 Dosagem de peroxidação lipídica (TBARS):

Para a dosagem de lipoperoxidação foi utilizada a técnica colorimétrica previamente publicada (BUEGE; AUST, 1978), uma técnica utilizada para avaliar oxidação de lipídios, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da peroxidação lipídica, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Foram adicionados 500 μ g de proteínas da amostra, ácido tricloroacético 30%(TCA) (p/v) e Tris-HCL 10 mM (pH 7,4), os quais passaram por agitação sequenciais de 1 minuto. Quando totalmente homogeneizadas, as amostras (500 μ g proteínas) foram centrifugadas por 10 min, 2500xg a 4°C e ao seu sobrenadante, uma alíquota de TBA 0,73% em igual volume foi adicionado. Esta mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e

imediatamente resfriada e transferidas para cubetas de quartzo, onde foram quantificadas em espectrofotômetro a uma absorbância de 535nm. Os resultados foram expressos em μm de MDA por mg de proteína (DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014).

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

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

4.13 AVALIAÇÕES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA

4.13.1 Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)

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

4.13.2 Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT)

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

4.13.3 Atividade da enzima antioxidante Glutathione-S-Transferase (GST)

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

4.14 AVALIAÇÃO DA DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA

4.14.1 Qualificação do balanço REDOX (razão GSH/GSSG)

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

Para a determinação dos níveis de glutathione oxidada (GSSG), 500 µg de proteína foram primeiramente incubados com N-ethylmaleimide (NEM) 0,04M, por 30 minutos a temperatura ambiente seguido da adição do tampão NaOH 0,1M ao meio. Após esse procedimento, as amostras também foram incubadas com o-phthalaldehyde (OPT) 1mg/mL em temperatura ambiente, por 15 minutos e tiveram sua fluorescência comparada a uma curva de concentrações

conhecidas de GSSG. (HISSIN; HILF, 1976). Para obtenção do balanço REDOX celular foi calculada a razão entre os níveis de GSH pelos de GSSG.

4.14.2 Quantificação dos grupamentos tióis totais (Sulfidrilas)

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

4.15 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS SIRTUÍNAS PELA METODOLOGIA “*REAL TIME-PCR*”

O RNA total foi obtido do ventrículo cardíaco esquerdo dos 4 grupos experimentais pelo método de extração com isotiocianato de guanidina usando o reagente Trizol. A quantificação do RNA foi realizada em duplicata diluindo as amostras em água isenta de RNase. A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise da pureza do RNA, o valor da absorbância obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280nm e as amostras que apresentaram a razão 260/280 igual ou superior a 1.8 foram utilizadas (indicativo de alto grau de pureza). 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) (SuperScript III, Platinum One-Step, Invitrogen, California, EUA). A avaliação foi realizada por 2-Δ-ΔCT (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), utilizando o gene β-actina como controle interno (normalizador) para normalização de expressão gênica por PCR *em tempo real*.

Tabela 1: Sequência de *Primers* para cada gene estudado.

Gene	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')
SIRT1	CTGTTTCCTGTGGGATACCTGACT	ATCGAACATGGCTTGAGGATCT
SIRT3	GGCACTACAGGCCCAATGTC	TCTCTCAAGCCCGTCGATGT
B-ACT	CCCGCGAGTACAACCTTCT	CGTCATCCATGGCGAACT

4.16 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEÍCA DAS SINTUÍNAS 1 E 3 E DOS NÍVEIS DE ACETILAÇÃO DAS LISINAS CARDÍACAS

Alíquotas de cada amostra foram submetidas à eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida. Com o gel contendo as proteínas separadas por eletroforese foi montado um “sanduíche” onde a membrana de nitrocelulose permaneceu em contato direto com o gel, havendo contato com uma folha de papel filtro e uma esponja de cada lado. As proteínas do gel foram então transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose, por aproximadamente 10 horas, a 15 V, a uma temperatura de 4°C. As membranas já carregadas com as proteínas foram incubadas em solução bloqueadora (5% de leite desnatado em solução basal - Tris-HCl, NaCl e Tween 20) overnight, na sequência, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico para avaliação da SIRT-1 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology; sc-74465, EUA), ou SIRT-3 (Boster BioTechnology: A01061-1, EUA), ou acetilação (1:1000) (ABIN-3181587, EUA). Após o tempo de incubação, as membranas foram lavadas para a remoção do excesso do anticorpo primário e novamente incubadas, mas agora com o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com a peroxidase. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o substrato para a peroxidase e expostas a filmes de raio-X. As intensidades das bandas das auto-radiografias foram quantificadas por densitometria óptica, pelo programa Image J (NIH, Maryland, EUA). A normalização das bandas foi realizada usando o corante Ponceau S (LAGRANHA; DESCHAMPS; APONTE; STEENBERGEN *et al.*, 2010).

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição das amostras utilizando os testes de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para avaliar os dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunns*. O nível de

significância foi mantido em 5% para todas as análises. Os dados que estiveram dentro da distribuição gaussiana foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram analisados pelo teste *ANOVA two-way*. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão Mac 2011, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostram que uma restrição proteica materna tem um impacto negativo nas mitocôndrias cardíacas de sua respectiva prole. Podemos observar que o treinamento físico moderado na prole durante o estágio juvenil restaura o equilíbrio oxidativo do coração, sendo estas alterações moduladas pelas sirtuínas. Com base nesses resultados, sugerimos que a invenção precoce do exercício físico moderado em crianças que sofreram privações nutricionais nas fases iniciais da vida pode atrasar ou até mesmo impedir o desenvolvimento de doenças crônicas.

REFERÊNCIAS

In: Global Recommendations on Physical Activity for Health. Geneva, 2010. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee).

ADES, P. A.; KETHEYIAN, S. J.; BALADY, G. J.; HOUSTON-MILLER, N. *et al*. Cardiac rehabilitation exercise and self-care for chronic heart failure. **JACC Heart Fail**, 1, n. 6, p. 540-547, Dec 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.

AHMAD, M.; WOLBERG, A.; KAHWAJI, C. I. Biochemistry, Electron Transport Chain. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2021.

AHUJA, P.; SDEK, P.; MACLELLAN, W. R. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. **Physiol Rev**, 87, n. 2, p. 521-544, Apr 2007.

ALMEIDA, M. M.; DIAS-ROCHA, C. P.; SOUZA, A. S.; MUROS, M. F. *et al*. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. **Br J Nutr**, 118, n. 10, p. 788-803, Nov 2017.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.

ASCENSAO, A. A.; MAGALHAES, J. F.; SOARES, J. M.; FERREIRA, R. M. *et al*. Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. **Int J Sports Med**, 26, n. 4, p. 258-267, May 2005.

BACKS, J.; OLSON, E. N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. **Circ Res**, 98, n. 1, p. 15-24, Jan 6 2006.

BADR, G.; MOHANY, M. Maternal perinatal undernutrition attenuates T-cell function in adult male rat offspring. **Cell Physiol Biochem**, 27, n. 3-4, p. 381-390, 2011.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res**, 21, n. 3, p. 381-395, Mar 2011.

BARBOSA, V. A.; LUCIANO, T. F.; VITTO, M. F.; CESCINETTO, P. A. *et al*. Exercise training plays cardioprotection through the oxidative stress reduction in obese rats submitted to myocardial infarction. **Int J Cardiol**, 157, n. 3, p. 422-424, Jun 14 2012.

BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, 301, n. 6761, p. 1111, Nov 17 1990.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, 311, n. 6998, p. 171-174, Jul 15 1995.

BARKER, D. J. Early growth and cardiovascular disease. **Arch Dis Child**, 80, n. 4, p. 305-307, Apr 1999a.

BARKER, D. J. Why heart disease mortality is low in France. Commentary: intrauterine nutrition may be important. **BMJ**, 318, n. 7196, p. 1477-1478, May 29 1999b.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BARKER, D. J.; CLARK, P. M. Fetal undernutrition and disease in later life. **Rev Reprod**, 2, n. 2, p. 105-112, May 1997.

BARKER, D. J.; FORSEN, T.; ERIKSSON, J. G.; OSMOND, C. Growth and living conditions in childhood and hypertension in adult life: a longitudinal study. **J Hypertens**, 20, n. 10, p. 1951-1956, Oct 2002.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. **J Epidemiol Community Health**, 40, n. 1, p. 37-44, Mar 1986.

BARKER, D. J.; OSMOND, C.; LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **J Epidemiol Community Health**, 43, n. 3, p. 237-240, Sep 1989.

BARKER, D. J.; WINTER, P. D.; OSMOND, C.; MARGETTS, B. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, 2, n. 8663, p. 577-580, Sep 9 1989.

BARROS, M. A.; DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; WANDERLEY, A. G. *et al.* Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 25, n. 1, p. 123-130, Jan 2015.

BASTIN, J. Regulation of mitochondrial fatty acid beta-oxidation in human: what can we learn from inborn fatty acid beta-oxidation deficiencies? **Biochimie**, 96, p. 113-120, Jan 2014.

BATESON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T.; DEB, D. *et al.* Developmental plasticity and human health. **Nature**, 430, n. 6998, p. 419-421, Jul 22 2004.

BEAUCHAMP, B.; HARPER, M. E. In utero Undernutrition Programs Skeletal and Cardiac Muscle Metabolism. **Front Physiol**, 6, p. 401, 2016.

BELLO-KLEIN, A.; LAGRANHA, C. J.; BOCK, P.; BELLO, A. A. *et al.* Submaximal exercise training in postnatal rats: Hemodynamic and oxidative stress changes. **Exp Clin Cardiol**, 5, n. 3, p. 149-153, 2000.

BERGLUND, S. K.; GARCIA-VALDES, L.; TORRES-ESPINOLA, F. J.; SEGURA, M. T. *et al.* Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE). **BMC Public Health**, 16, p. 207, Mar 1 2016.

BERRIDGE, M. J. Calcium signalling remodelling and disease. **Biochem Soc Trans**, 40, n2, p. 297-309, Apr 2012.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4, n. 7, p. 517-529, Jul 2003.

BING, R. J.; SIEGEL, A.; UNGAR, I.; GILBERT, M. Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. **Am J Med**, 16, n. 4, p. 504-515, Apr 1954.

BLOM, N. A.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; DERUITER, M. C.; POELMANN, R. E. *et al.* Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression: possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. **Circulation**, 99, n. 6, p. 800-806, Feb 16 1999.

BLOMSTRAND, E.; RADEGRAN, G.; SALTIN, B. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. **J Physiol**, 501 (Pt 2), p. 455-460, Jun 1 1997.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. **Free Radic Biol Med**, 44, n. 2, p. 224-229, Jan 15 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRAY, G. A. Complications of obesity. **Ann Intern Med**, 103, n. 6 (Pt 2), p. 1052-1062, Dec 1985.

BRAZ, G. R.; FERREIRA, D.; PEDROZA, A.; DA SILVA, A. I. *et al.* Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, 40, n. xx, 2015. Short Communication.

BRAZ, G. R.; PEDROZA, A. A.; NOGUEIRA, V. O.; DE VASCONCELOS BARROS, M. A. *et al.* Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rats: Hemodynamics and oxidative stress analysis. **Life Sci**, 145, p. 42-50, Jan 15 2016.

BRDICZKA, D. G.; ZOROV, D. B.; SHEU, S. S. Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, 1762, n. 2, p. 148-163, Feb 2006.

BRESLOW, L. Public health aspects of weight control. **Am J Public Health Nations Health**, 42, n. 9, p. 1116-1120, Sep 1952.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, 45, n. 6, p. 1009-1015, Dec 1978.

BUCKINGHAM, M.; MEILHAC, S.; ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. **Nat Rev Genet**, 6, n. 11, p. 826-835, Nov 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-

310, 1978.

BURRELL, J. H.; BOYN, A. M.; KUMARASAMY, V.; HSIEH, A. *et al.* Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, 274, n. 2, p. 952-961, Oct 2003.

BURTON, G. J. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. **J Anat**, 215, n. 1, p. 27-35, Jul 2009.

BUTTS, B.; BUTLER, J.; DUNBAR, S. B.; CORWIN, E. *et al.* Effects of Exercise on ASC Methylation and IL-1 Cytokines in Heart Failure. **Med Sci Sports Exerc**, 50, n. 9, p. 1757-1766, Sep 2018.

BYRN, R. A.; MORDENTI, J.; LUCAS, C.; SMITH, D. *et al.* Biological properties of a CD4 immunoadhesin. **Nature**, 344, n. 6267, p. 667-670, Apr 12 1990.

CAPPELLI, A. P. G.; ZOPPI, C. C.; SILVEIRA, L. R.; BATISTA, T. M. *et al.* Reduced glucose-induced insulin secretion in low-protein-fed rats is associated with altered pancreatic islets redox status. **J Cell Physiol**, 233, n. 1, p. 486-496, Jan 2018.

CARSON, V.; RIDGERS, N. D.; HOWARD, B. J.; WINKLER, E. A. *et al.* Light-intensity physical activity and cardiometabolic biomarkers in US adolescents. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e71417, 2013.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, 100, n. 2, p. 126-131, Mar-Apr 1985.

CHEN, F.; DE DIEGO, C.; CHANG, M. G.; MCHARG, J. L. *et al.* Atrioventricular conduction and arrhythmias at the initiation of beating in embryonic mouse hearts. **Dev Dyn**, 239, n. 7, p. 1941-1949, Jul 2010.

CHEUNG, K. G.; COLE, L. K.; XIANG, B.; CHEN, K. *et al.* Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. **J Biol Chem**, 290, n. 17, p. 10981-10993, Apr 24 2015.

CHICO, L.; RICCI, G.; COSCI, O. D. C. M.; SIMONCINI, C. *et al.* Physical exercise and oxidative stress in muscular dystrophies: is there a good balance? **Arch Ital Biol**, 155, n. 1-2, p. 11-24, Jul 1 2017

COLAVITTI, R.; FINKEL, T. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. **IUBMB Life**, 57, n. 4-5, p. 277-281, Apr-May 2005.

COLLDEN, G.; BALLAND, E.; PARKASH, J.; CARON, E. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. **Mol Metab**, 4, n. 1, p. 15-24, Jan 2015.

CONWAY, S. J.; KRUYNSKA-FREJTAG, A.; KNEER, P. L.; MACHNICKI, M. *et al.* What cardiovascular defect does my prenatal mouse mutant have, and why? **Genesis**, 35, n. 1, p. 1-21, Jan 2003.

COOPER, H. M.; SPELBRINK, J. N. The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial. **Biochem J**, 411, n. 2, p. 279-285, Apr 15 2008.

COSTELLOE, T.; FITZGERALD, J.; MURPHY, N. J.; FLAUS, A. *et al.* Chromatin modulation and the DNA damage response. **Exp Cell Res**, 312, n. 14, p. 2677-2686, Aug 15 2006.

DA SILVA, A. I.; BRAZ, G. R.; SILVA-FILHO, R.; PEDROZA, A. A. *et al.* Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. **Appl Physiol Nutr Metab**, 40, n. 6, p. 565-574, Jun 2015.

DA SILVA, A. I.; MONTEIRO GALINDO, L. C.; NASCIMENTO, L.; MOURA FREITAS, C. *et al.* Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Can J Physiol Pharmacol**, 92, n. 4, p. 330-337, Apr 2014.

DA SILVA BARRETO, J.; DE MELO TAROUÇO, F.; DE GODOI, F. G. A.; GEIHS, M. A. *et al.* Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta*. **Aquat Toxicol**, 196, p. 1-8, Mar 2018.

DA SILVA PEDROZA, A. A.; LOPES, A.; MENDES DA SILVA, R. F.; BRAZ, G. R. *et al.* Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? **Life Sci**, 137, p. 133-141, Sep 15 2015.

DAEHN, I.; CASALENA, G.; ZHANG, T.; SHI, S. *et al.* Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. **J Clin Invest**, 124, n. 4, p. 1608-1621, Apr 2014.

DAVIS, A. L. Fighting obesity: physical activity has major role. **BMJ**, 329, n. 7456, p. 53, Jul 3 2004.

DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; DE OLIVEIRA, G. B.; DA SILVA, G. S. *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, 111, n. 4, p. 606-615, Feb 2014.

DENHAM, J. Exercise and epigenetic inheritance of disease risk. **Acta Physiol (Oxf)**, 222, n. 1, Jan 2018.

DENNISON, E.; FALL, C.; COOPER, C.; BARKER, D. Prenatal factors influencing long-term outcome. **Horm Res**, 48 Suppl 1, p. 25-29, 1997.

DERUITER, M. C.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; POELMANN, R. E.; VANIPEREN, L. *et al.* Development of the pharyngeal arch system related to the pulmonary and bronchial vessels in the avian embryo. With a concept on systemic-pulmonary collateral artery formation. **Circulation**, 87, n. 4, p. 1306-1319, Apr 1993.

DERUITER, M. C.; POELMANN, R. E.; VANDERPLAS-DE VRIES, I.; MENTINK, M. M. *et al.* The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? **Anat Embryol (Berl)**, 185, n. 5, p. 461-473, 1992.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU, J.; ROSS, M. G. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. **Am J Obstet Gynecol**, 193, n. 3 Pt 2, p. 1224-1232, Sep 2005.

DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the

Brain. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 159, p. 503-509, Feb 18 1964.

DOBBING, J.; SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediatr**, 42, n. 3, p. 199-203, Mar 1985.

DRENCKHAHN, J. D. Growth plasticity of the embryonic and fetal heart. **Bioessays**, 31, n. 12, p. 1288-1298, Dec 2009.

DUCHEN, M. R. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. **J Physiol**, 516 (Pt 1), p. 1-17, Apr 1 1999.

DUCHEN, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **J Physiol**, 529 Pt 1, p. 57-68, Nov 15 2000.

EDVARDSSON, V. O.; STEINTHORSDDOTTIR, S. D.; ELIASDOTTIR, S. B.; INDRIDASON, O. S. *et al.* Birth weight and childhood blood pressure. **Curr Hypertens Rep**, 14, n. 6, p. 596-602, Dec 2012.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, 82, n. 1, p. 70-77, May 1959.

ERASLAN, G.; KANBUR, M.; KARABACAK, M.; ARSLAN, K. *et al.* Effect on oxidative stress, hepatic chemical metabolizing parameters, and genotoxic damage of mad honey intake in rats. **Hum Exp Toxicol**, p. 960327117745691, Jan 1 2017.

ERIKSSON, J. G.; FORSEN, T.; TUOMILEHTO, J.; OSMOND, C. *et al.* Early growth, adult income, and risk of stroke. **Stroke**, 31, n. 4, p. 869-874, Apr 2000.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, 23, n. 5, p. 599-622, Oct 2002.

FELDBERG, W.; GUERTZENSTEIN, P. G. A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. **J Physiol**, 224, n. 1, p. 83-103, Jul 1972.

FERREIRA, D. J. S.; DA SILVA PEDROZA, A. A.; BRAZ, G. R. F.; DA SILVA-FILHO, R. C. *et al.* Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. **Brain Res**, 1642, p. 553-561, Jul 1 2016.

FERREIRA, D. S.; LIU, Y.; FERNANDES, M. P.; LAGRANHA, C. J. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, 19, n. 8, p. 369-375, Oct 2016.

FERREIRA, R.; VITORINO, R.; PADRAO, A. I.; ESPADAS, G. *et al.* Lifelong exercise training modulates cardiac mitochondrial phosphoproteome in rats. **J Proteome Res**, 13, n. 4, p. 2045-2055, Apr 4 2014.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol**, 194, n. 1, p. 7-15, Jul 11 2011.

FISCHER, A.; TEN HOVE, M.; SEBAG-MONTEFIORE, L.; WAGNER, H. *et al.* Changes in creatine transporter function during cardiac maturation in the rat. **BMC Dev Biol**, 10, p. 70,

Jun 22 2010.

FISHER, S. A.; BURGGREN, W. W. Role of hypoxia in the evolution and development of the cardiovascular system. **Antioxid Redox Signal**, 9, n. 9, p. 1339-1352, Sep 2007.

FLEMMING, N. B.; GALLO, L. A.; FORBES, J. M. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Diabetic Kidney Disease: Oxidative Stress and Beyond. **Semin Nephrol**, 38, n. 2, p. 101-110, Mar 2018.

FORMAN, H. J.; THOMAS, M. J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. **Annu Rev Physiol**, 48, p. 669-680, 1986.

FORSDAHL, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? **Br J Prev Soc Med**, 31, n. 2, p. 91-95, Jun 1977.

FRANKEL, S.; ELWOOD, P.; SWEETNAM, P.; YARNELL, J. *et al.* Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. **Lancet**, 348, n. 9040, p. 1478-1480, Nov 30 1996.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **J Biol Chem**, 272, n. 30, p. 18515-18517, Jul 25 1997.

GAO, Y.; RAJ, J. U. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. **Physiol Rev**, 90, n. 4, p. 1291-1335, Oct 2010.

GHARBI, Z.; DARDOURI, W.; HAJ-SASSI, R.; CHAMARI, K. *et al.* Aerobic and anaerobic determinants of repeated sprint ability in team sports athletes. **Biol Sport**, 32, n. 3, p. 207-212, Sep 2015.

GIBB, A. A.; HILL, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. **Circ Res**, 123, n. 1, p. 107-128, Jun 22 2018.

GIVERTZ, M. M.; SAWYER, D. B.; COLUCCI, W. S. Antioxidants and myocardial contractility: illuminating the "Dark Side" of beta-adrenergic receptor activation? **Circulation**, 103, n. 6, p. 782-783, Feb 13 2001.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, 15, n. 4, p. 183-187, May-Jun 2004.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; SPENCER, H. G. Predictive adaptive responses and human evolution. **Trends Ecol Evol**, 20, n. 10, p. 527-533, Oct 2005.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, 128, n. 4, p. 635-638, Feb 23 2007.

GRYNBERG, A.; DEMAISON, L. Fatty acid oxidation in the heart. **J Cardiovasc Pharmacol**, 28 Suppl 1, p. S11-17, 1996.

GUEANT, J. L.; DAVAL, J. L.; VERT, P.; NICOLAS, J. P. [Folates and fetal programming: role of epigenetics and epigenomics]. **Bull Acad Natl Med**, 196, n. 9, p. 1829-1842, Dec 2012.

GUO, R.; ZONG, S.; WU, M.; GU, J. *et al.* Architecture of Human Mitochondrial Respiratory

Megacomplex I2III2IV2. **Cell**, 170, n. 6, p. 1247-1257 e1212, Sep 7 2017.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 5, p. 335-346, May 2006.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z. *et al.* The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 71, n. 10, p. 3879-3882, Oct 1974.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov 25 1974.

HAHN, P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. **J Nutr**, 114, n. 7, p. 1231-1234, Jul 1984.

HAJNOCZKY, G.; ROBB-GASPERS, L. D.; SEITZ, M. B.; THOMAS, A. P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. **Cell**, 82, n. 3, p. 415-424, Aug 11 1995.

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

HALESTRAP, A. P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. **Biochim Biophys Acta**, 973, n. 3, p. 355-382, Mar 23 1989.

HALESTRAP, A. P.; PASDOIS, P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. **Biochim Biophys Acta**, 1787, n. 11, p. 1402-1415, Nov 2009.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, Nov 2007.

HANSFORD, R. G. Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. **J Bioenerg Biomembr**, 26, n. 5, p. 495-508, Oct 1994.

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

HAO, X. Q.; ZHANG, H. G.; YUAN, Z. B.; YANG, D. L. *et al.* Prenatal exposure to lipopolysaccharide alters the intrarenal renin-angiotensin system and renal damage in offspring rats. **Hypertens Res**, 33, n. 1, p. 76-82, Jan 2010.

HARIHARAN, N.; MAEJIMA, Y.; NAKAE, J.; PAIK, J. *et al.* Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. **Circ Res**, 107, n. 12, p. 1470-1482, Dec 10 2010.

HEVLER, J. F.; ZENEZENI CHIOZZI, R.; CABRERA-OREFICE, A.; BRANDT, U. *et al.* Molecular characterization of a complex of apoptosis-inducing factor 1 with cytochrome c oxidase of the mitochondrial respiratory chain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 39, Sep 28 2021.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced

glutathione in tissues. **Anal Biochem**, 74, n. 1, p. 214-226, Jul 1976.

HOM, J.; SHEU, S. S. Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. **J Mol Cell Cardiol**, 46, n. 6, p. 811-820, Jun 2009.

HOPPEL, C. L.; KERNER, J.; TURKALY, P.; TURKALY, J. *et al.* The malonyl-CoA-sensitive form of carnitine palmitoyltransferase is not localized exclusively in the outer membrane of rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, 273, n. 36, p. 23495-23503, Sep 4 1998.

HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomed Rep**, 4, n. 5, p. 519-522, May 2016.

IMAI, S.; GUARENTE, L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. **Trends Pharmacol Sci**, 31, n. 5, p. 212-220, May 2010.

IWATA, S.; LEE, J. W.; OKADA, K.; LEE, J. K. *et al.* Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. **Science**, 281, n. 5373, p. 64-71, Jul 3 1998.

JASTROCH, M.; DIVAKARUNI, A. S.; MOOKERJEE, S.; TREBERG, J. R. *et al.* Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays Biochem**, 47, p. 53-67, 2010.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, 293, n. 5532, p. 1074-1080, Aug 10 2001.

Jl, Y. H.; SUN, H. Y. [Cardiac excitation-contraction coupling mediated by Ca²⁺]. **Shi Yan Sheng Wu Xue Bao**, 37, n. 1, p. 78-83, Feb 2004.

JING, E.; EMANUELLI, B.; HIRSCHHEY, M. D.; BOUCHER, J. *et al.* Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 35, p. 14608-14613, Aug 30 2011.

KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, 19, n. 11, p. 42, Sep 18 2017.

KEATING, S. T.; EL-OSTA, A. Epigenetics and metabolism. **Circ Res**, 116, n. 4, p. 715-736, Feb 13 2015.

KERMACK, W. O.; MCKENDRICK, A. G.; MCKINLAY, P. L. Death-rates in Great Britain and Sweden: Expression of Specific Mortality Rates as Products of Two Factors, and some Consequences thereof. **J Hyg (Lond)**, 34, n. 4, p. 433-457, Dec 1934.

KETHEYIAN, S. J.; SQUIRES, R. W.; ADES, P. A.; THOMAS, R. J. Incorporating patients with chronic heart failure into outpatient cardiac rehabilitation: practical recommendations for exercise and self-care counseling-a clinical review. **J Cardiopulm Rehabil Prev**, 34, n. 4, p. 223-232, Jul-Aug 2014.

KEVERNE, E. B.; CURLEY, J. P. Epigenetics, brain evolution and behaviour. **Front Neuroendocrinol**, 29, n. 3, p. 398-412, Jun 2008.

KINDO, M.; GERELLI, S.; BOUITBIR, J.; CHARLES, A. L. *et al.* Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. **Front Physiol**, 3, p.

332, 2012.

KOLWICZ, S. C., Jr.; OLSON, D. P.; MARNEY, L. C.; GARCIA-MENENDEZ, L. *et al.* Cardiac-specific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressure-overload hypertrophy. **Circ Res**, 111, n. 6, p. 728-738, Aug 31 2012.

KOLWICZ, S. C., Jr.; PUROHIT, S.; TIAN, R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. **Circ Res**, 113, n. 5, p. 603-616, Aug 16 2013.

KOU, C. Y.; LAU, S. L.; AU, K. W.; LEUNG, P. Y. *et al.* Epigenetic regulation of neonatal cardiomyocytes differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, 400, n. 2, p. 278-283, Sep 17 2010.

KRAEMER, W. J.; ADAMS, K.; CAFARELLI, E.; DUDLEY, G. A. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, 34, n. 2, p. 364-380, Feb 2002.

KUMA, A.; HATANO, M.; MATSUI, M.; YAMAMOTO, A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, 432, n. 7020, p. 1032-1036, Dec 23 2004.

LAGRANHA, C. J.; DESCHAMPS, A.; APONTE, A.; STEENBERGEN, C. *et al.* Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. **Circ Res**, 106, n. 11, p. 1681-1691, Jun 11 2010.

LANDGRAVE-GOMEZ, J.; MERCADO-GOMEZ, O.; GUEVARA-GUZMAN, R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci**, 9, p. 58, 2015.

LARSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, C. N.; NIELSEN, L. B. *et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **J Physiol**, 590, n. 14, p. 3349-3360, Jul 15 2012.

LAVERRIERE, A. C.; MACNEILL, C.; MUELLER, C.; POELMANN, R. E. *et al.* GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. **J Biol Chem**, 269, n. 37, p. 23177-23184, Sep 16 1994.

LAWLOR, D. A.; BATTY, G. D.; MORTON, S. M.; DEARY, I. J. *et al.* Early life predictors of childhood intelligence: evidence from the Aberdeen children of the 1950s study. **J Epidemiol Community Health**, 59, n. 8, p. 656-663, Aug 2005.

LEE, I. H.; CAO, L.; MOSTOSLAVSKY, R.; LOMBARD, D. B. *et al.* A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 9, p. 3374-3379, Mar 4 2008.

LEHMANN, L. H.; JEBESSA, Z. H.; KREUSSER, M. M.; HORSCH, A. *et al.* A proteolytic fragment of histone deacetylase 4 protects the heart from failure by regulating the hexosamine biosynthetic pathway. **Nat Med**, 24, n. 1, p. 62-72, Jan 2018.

LEON, D. A.; LITHELL, H. O.; VAGERO, D.; KOUPILOVA, I. *et al.* Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. **BMJ**, 317, n. 7153, p. 241-245, Jul 25 1998.

LI, F.; WANG, X.; CAPASSO, J. M.; GERDES, A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **J Mol Cell Cardiol**, 28, n. 8, p. 1737-1746, Aug 1996.

LI, G. R.; DU, X. L.; SLOW, Y. L.; O, K. *et al.* Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. **Cardiovasc Res**, 58, n. 1, p. 89-98, Apr 1 2003.

LI, L.; ZHU, J.; TIAN, J.; LIU, X. *et al.* A role for Gcn5 in cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Mol Cell Biochem**, 345, n. 1-2, p. 309-316, Dec 2010.

LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C. Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 26, n. 5, p. 667-676, Oct 2012.

LINASK, K. K.; LASH, J. W. A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. II. Rotation of the heart-forming region during different stages and its effects. **Dev Biol**, 129, n. 2, p. 324-329, Oct 1988.

LINDSTROM, J.; ILANNE-PARIKKA, P.; PELTONEN, M.; AUNOLA, S. *et al.* Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. **Lancet**, 368, n. 9548, p. 1673-1679, Nov 11 2006.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K. U.; STENVINKEL, P. *et al.* Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, 18, n. 7, p. 1272-1280, Jul 2003.

LOMBARD, D. B.; ALT, F. W.; CHENG, H. L.; BUNKENBORG, J. *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. **Mol Cell Biol**, 27, n. 24, p. 8807-8814, Dec 2007.

LOPASCHUK, G. D.; BELKE, D. D.; GAMBLE, J.; ITOI, T. *et al.* Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. **Biochim Biophys Acta**, 1213, n. 3, p. 263-276, Aug 4 1994.

LOPASCHUK, G. D.; JASWAL, J. S. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. **J Cardiovasc Pharmacol**, 56, n. 2, p. 130-140, Aug 2010.

MAECHLER, P.; CAROBBIO, S.; RUBI, B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. **Int J Biochem Cell Biol**, 38, n. 5-6, p. 696-709, 2006.

MANNELLA, C. A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. **Biochim Biophys Acta**, 1763, n. 5-6, p. 542-548, May-Jun 2006.

MANOHAR, M.; MOONEY, A. M.; NORTH, J. A.; NAKKULA, R. J. *et al.* Acetylation of histone H3 at the nucleosome dyad alters DNA-histone binding. **J Biol Chem**, 284, n. 35, p. 23312-23321, Aug 28 2009.

MARTINEZ, D.; PENTINAT, T.; RIBO, S.; DAVIAUD, C. *et al.* In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. **Cell Metab**, 19, n. 6, p. 941-951, Jun 3 2014.

MARTINEZ, D. G.; NICOLAU, J. C.; LAGE, R. L.; TOSCHI-DIAS, E. *et al.* Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. **Hypertension**, 58, n. 6, p. 1049-1056, Dec 2011.

MARTYN, C. N.; BARKER, D. J.; OSMOND, C. Mothers' pelvic size, fetal growth, and death from stroke and coronary heart disease in men in the UK. **Lancet**, 348, n. 9037, p. 1264-1268, Nov 9 1996.

MATHIESEN, C.; CAESAR, K.; THOMSEN, K.; HOOGLAND, T. M. *et al.* Activity-dependent increases in local oxygen consumption correlate with postsynaptic currents in the mouse cerebellum in vivo. **J Neurosci**, 31, n. 50, p. 18327-18337, Dec 14 2011.

MCCANCE, R. A. Food, growth, and time. **Lancet**, 2, n. 7257, p. 621-626, Sep 29 1962.

MCCORMACK, J. G.; HALESTRAP, A. P.; DENTON, R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. **Physiol Rev**, 70, n. 2, p. 391-425, Apr 1990.

MCGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **Eur J Biochem**, 244, n. 1, p. 1-14, Feb 15 1997.

MEISTER, A. Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, Spec No, p. 1-6, 1992.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 247, n. 10, p. 3170-3175, May 25 1972.

MOORE, L. K.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. São Paulo: Elsevier, 2008.

MOORMAN, A. F.; CHRISTOFFELS, V. M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. **Physiol Rev**, 83, n. 4, p. 1223-1267, Oct 2003.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, 26, n. 4, p. 471-483, Jun 2002.

MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J. *et al.* Trans fatty acids and cardiovascular disease. **N Engl J Med**, 354, n. 15, p. 1601-1613, Apr 13 2006.

MUSUNURU, K.; DOMIAN, I. J.; CHIEN, K. R. Stem cell models of cardiac development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 26, p. 667-687, 2010.

NASCIMENTO, L.; FREITAS, C. M.; SILVA-FILHO, R.; LEITE, A. C. *et al.* The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab**, 39, n. 8, p. 880-887, Aug 2014.

NATIONAL KIDNEY, F. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. **Am J Kidney Dis**, 60, n. 5, p. 850-886, Nov 2012.

NATT, D.; BARCHIESI, R.; MURAD, J.; FENG, J. *et al.* Perinatal Malnutrition Leads to Sexually Dimorphic Behavioral Responses with Associated Epigenetic Changes in the Mouse Brain. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 11082, Sep 11 2017.

- NAWROCKA, A.; MYNARSKI, W. Objective Assessment of Adherence to Global Recommendations on Physical Activity for Health in Relation to Spirometric Values in Nonsmoker Women Aged 60-75 Years. **J Aging Phys Act**, 25, n. 1, p. 123-127, Jan 2017.
- NEELY, J. R.; MORGAN, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. **Annu Rev Physiol**, 36, p. 413-459, 1974.
- NEMOTO, S.; FERGUSSON, M. M.; FINKEL, T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. **Science**, 306, n. 5704, p. 2105-2108, Dec 17 2004.
- NESBITT, T.; LEMLEY, A.; DAVIS, J.; YOST, M. J. *et al.* Epicardial development in the rat: a new perspective. **Microsc Microanal**, 12, n. 5, p. 390-398, Oct 2006.
- NEUBAUER, S. The failing heart--an engine out of fuel. **N Engl J Med**, 356, n. 11, p. 1140-1151, Mar 15 2007.
- OLSON, E. N.; SRIVASTAVA, D. Molecular pathways controlling heart development. **Science**, 272, n. 5262, p. 671-676, May 3 1996.
- ONYANGO, P.; CELIC, I.; MCCAFFERY, J. M.; BOEKE, J. D. *et al.* SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 21, p. 13653-13658, Oct 15 2002.
- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4, n. 7, p. 552-565, Jul 2003.
- OZAKI, T.; NISHINA, H.; HANSON, M. A.; POSTON, L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. **J Physiol**, 530, n. Pt 1, p. 141-152, Jan 1 2001.
- PARDO, A. C.; RINALDI, G. J.; MOSCA, S. M. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: correlation with systolic blood pressure levels. **Mitochondrion**, 20, p. 75-81, Jan 2015.
- PATEL, H.; ALKHAWAM, H.; MADANIEH, R.; SHAH, N. *et al.* Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. **World J Cardiol**, 9, n. 2, p. 134-138, Feb 26 2017.
- PEDROZA, A.; FERREIRA, D. S.; SANTANA, D. F.; DA SILVA, P. T. *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. **Appl Physiol Nutr Metab**, 44, n. 2, p. 164-171, Feb 2019.
- PEPINO, M. Y.; KUDA, O.; SAMOVSKI, D.; ABUMRAD, N. A. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. **Annu Rev Nutr**, 34, p. 281-303, 2014.
- PEUHKURINEN, K. J.; HASSINEN, I. E. Pyruvate carboxylation as an anaplerotic mechanism in the isolated perfused rat heart. **Biochem J**, 202, n. 1, p. 67-76, Jan 15 1982.
- PEUHKURINEN, K. J.; NUUTINEN, E. M.; PIETILAINEN, E. P.; HILTUNEN, J. K. *et al.* Role of pyruvate carboxylation in the energy-linked regulation of pool sizes of tricarboxylic acid-cycle intermediates in the myocardium. **Biochem J**, 208, n. 3, p. 577-581, Dec 15 1982.

PHOON, C. K. Circulatory physiology in the developing embryo. **Curr Opin Pediatr**, 13, n. 5, p. 456-464, Oct 2001.

PI-SUNYER, F. X. Medical hazards of obesity. **Ann Intern Med**, 119, n. 7 Pt 2, p. 655-660, Oct 1 1993.

PIERCY, K. L.; TROIANO, R. P.; BALLARD, R. M.; CARLSON, S. A. *et al.* The Physical Activity Guidelines for Americans. **JAMA**, 320, n. 19, p. 2020-2028, Nov 20 2018.

PIQUEREAU, J.; VENTURA-CLAPIER, R. Maturation of Cardiac Energy Metabolism During Perinatal Development. **Front Physiol**, 9, p. 959, 2018.

POLLOCK, M. L. The quantification of endurance training programs. **Exerc Sport Sci Rev**, 1, p. 155-188, 1973.

PORTER, G. A., Jr.; HOM, J.; HOFFMAN, D.; QUINTANILLA, R. *et al.* Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. **Prog Pediatr Cardiol**, 31, n. 2, p. 75-81, May 2011.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, 50, n. 3, p. 222-233, Sep 2011.

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

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, 295, n. 7, p. 349-353, Aug 12 1976.

REED, J. L.; BLAIS, A. Z.; KEAST, M. L.; PIPE, A. L. *et al.* Performance of Fixed Heart Rate Increment Targets of 20 vs 30 Beats per Minute for Exercise Rehabilitation Prescription in Outpatients With Heart Failure. **Can J Cardiol**, 33, n. 6, p. 777-784, Jun 2017.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

REICHERT, A. S.; NEUPERT, W. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. **Biochim Biophys Acta**, 1592, n. 1, p. 41-49, Sep 2 2002.

RENTSCHLER, S.; VAIDYA, D. M.; TAMADDON, H.; DEGENHARDT, K. *et al.* Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. **Development**, 128, n. 10, p. 1785-1792, May 2001.

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

RHEE, S. G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science**, 312, n. 5782, p. 1882-1883, Jun 30 2006.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology

into clinical applications. **CMAJ**, 174, n. 3, p. 341-348, Jan 31 2006.

ROY, M. P. Malnutrition and Health Program. **Indian Pediatr**, 55, n. 1, p. 75, Jan 15 2018.

RUDARLI NALCAKAN, G.; NALCAKAN, M.; VAR, A.; TANELI, F. *et al.* Acute oxidative stress and antioxidant status responses following an American football match. **J Sports Med Phys Fitness**, 51, n. 3, p. 533-539, Sep 2011.

RUGGIERO, C.; EHRENSHAFT, M.; CLELAND, E.; STADLER, K. High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 300, n. 6, p. E1047-1058, Jun 2011.

SACK, M. N. Caloric excess or restriction mediated modulation of metabolic enzyme acetylation-proposed effects on cardiac growth and function. **Biochim Biophys Acta**, 1813, n. 7, p. 1279-1285, Jul 2011.

SADLER, T. W. Susceptible periods during embryogenesis of the heart and endocrine glands. **Environ Health Perspect**, 108 Suppl 3, p. 555-561, Jun 2000.

SCHNABEL, R. B.; BACCARELLI, A.; LIN, H.; ELLINOR, P. T. *et al.* Next steps in cardiovascular disease genomic research--sequencing, epigenetics, and transcriptomics. **Clin Chem**, 58, n. 1, p. 113-126, Jan 2012.

SCHOENWOLF, G. C.; GARCIA-MARTINEZ, V. Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. **Cell Mol Biol Res**, 41, n. 4, p. 233-240, 1995.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem J**, 360, n. Pt 1, p. 1-16, Nov 15 2001.

SHI, T.; WANG, F.; STIEREN, E.; TONG, Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. **J Biol Chem**, 280, n. 14, p. 13560-13567, Apr 8 2005.

SHIRODKAR, A. V.; MARSDEN, P. A. Epigenetics in cardiovascular disease. **Curr Opin Cardiol**, 26, n. 3, p. 209-215, May 2011.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; ISRAELSON, A.; BRDICZKA, D.; SHEU, S. S. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. **Curr Pharm Des**, 12, n. 18, p. 2249-2270, 2006.

SRINIVASAN, S.; BALDWIN, H. S.; ARISTIZABAL, O.; KWEE, L. *et al.* Noninvasive, in utero imaging of mouse embryonic heart development with 40-MHz echocardiography. **Circulation**, 98, n. 9, p. 912-918, Sep 1 1998.

SRIVASTAVA, D.; OLSON, E. N. A genetic blueprint for cardiac development. **Nature**, 407, n. 6801, p. 221-226, Sep 14 2000.

STEIN, C. E.; FALL, C. H.; KUMARAN, K.; OSMOND, C. *et al.* Fetal growth and coronary heart disease in south India. **Lancet**, 348, n. 9037, p. 1269-1273, Nov 9 1996.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Front Biosci**, 10, p. 1881-1896,

May 1 2005.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, 397, n. 6718, p. 441-446, Feb 4 1999.

SUVAKOV, S.; DAMJANOVIC, T.; STEFANOVIC, A.; PEKMEZOVIC, T. *et al.* Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, 28, n. 1, p. 202-212, Jan 2013.

TAEGMTMEYER, H.; LAM, T.; DAVOGUSTTO, G. Cardiac Metabolism in Perspective. **Compr Physiol**, 6, n. 4, p. 1675-1699, Sep 15 2016.

TAEGMTMEYER, H.; YOUNG, M. E.; LOPASCHUK, G. D.; ABEL, E. D. *et al.* Assessing Cardiac Metabolism: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circ Res**, 118, n. 10, p. 1659-1701, May 13 2016.

TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T. *et al.* Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119, n. 2, p. 301-311, Oct 1992.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 5, n. 4, p. 518-534, Jul 2016.

TANG, E. H.; LEUNG, F. P.; HUANG, Y.; FELETOU, M. *et al.* Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **Br J Pharmacol**, 151, n. 1, p. 15-23, May 2007.

TANNO, M.; SAKAMOTO, J.; MIURA, T.; SHIMAMOTO, K. *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. **J Biol Chem**, 282, n. 9, p. 6823-6832, Mar 2 2007.

TEPEL, M. Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia? **Nephrol Dial Transplant**, 18, n. 8, p. 1439-1442, Aug 2003.

TERADA, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Environ Health Perspect**, 87, p. 213-218, Jul 1990.

TIIVEL, T.; KADAYA, L.; KUZNETSOV, A.; KAAMBRE, T. *et al.* Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. **Mol Cell Biochem**, 208, n. 1-2, p. 119-128, May 2000.

TOMEK, R. J.; HOPPEL, C. L. Carnitine palmitoyltransferase in bovine fetal heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 170, n. 2, p. 716-723, Oct 1975.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, 22, n. 47, p. 7369-7375, Oct 20 2003.

TRINDADE, C. E. P.; DE NOBREGA, F. J.; TONETE, S. S. Q. Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: DE NÓBREGA, F. J. (Ed.). **Desnutrição: intra-uterina e pós-natal**. . Sao Paulo: Panamed Editorial, 1986.

TRIVEDI, C. M.; ZHU, W.; WANG, Q.; JIA, C. *et al.* Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. **Dev Cell**, 19, n. 3, p. 450-459, Sep 14 2010.

TRONICK, E.; HUNTER, R. G. Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. **Front Behav Neurosci**, 10, p. 107, 2016.

TSAI, W. C.; WU, H. Y.; PENG, Y. S.; YANG, J. Y. *et al.* Association of Intensive Blood Pressure Control and Kidney Disease Progression in Nondiabetic Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Intern Med**, 177, n. 6, p. 792-799, Jun 1 2017.

TURI, S.; NEMETH, I.; TORKOS, A.; SAGHY, L. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. **Free Radic Biol Med**, 22, n. 1-2, p. 161-168, 1997.

VIEIRA-FILHO, L. D.; LARA, L. S.; SILVA, P. A.; SANTOS, F. T. *et al.* Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal alpha-tocopherol during lactation. **Arch Biochem Biophys**, 505, n. 1, p. 91-97, Jan 01 2011.

VILLAR-MARTINI, V. C.; CARVALHO, J. J.; NEVES, M. F.; AGUILA, M. B. *et al.* Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. **J Hypertens Suppl**, 27, n. 6, p. S47-51, Aug 2009.

VIRAGH, S.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; POELMANN, R. E.; KALMAN, F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. **Anat Embryol (Berl)**, 188, n. 4, p. 381-393, Oct 1993.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **Int J Epidemiol**, 41, n. 1, p. 10-13, Feb 2012.

WAHID, A.; MANEK, N.; NICHOLS, M.; KELLY, P. *et al.* Quantifying the Association Between Physical Activity and Cardiovascular Disease and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Am Heart Assoc**, 5, n. 9, Sep 14 2016.

WHALEY-CONNELL, A. T.; CHOWDHURY, N. A.; HAYDEN, M. R.; STUMP, C. S. *et al.* Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: role of the renin-angiotensin system in the Ren2 transgenic rat. **Am J Physiol Renal Physiol**, 291, n. 6, p. F1308-1314, Dec 2006.

WHO, W. H. O. **Health topics Obesity**. 2017.

WIEGAND, G.; REMINGTON, S. J. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. **Annu Rev Biophys Biophys Chem**, 15, p. 97-117, 1986.

WINGEN, A. M.; FABIAN-BACH, C.; SCHAEFER, F.; MEHLS, O. Randomised multicentre study of a low-protein diet on the progression of chronic renal failure in children. European Study Group of Nutritional Treatment of Chronic Renal Failure in Childhood. **Lancet**, 349, n. 9059, p. 1117-1123, Apr 19 1997.

WINICK, M.; ROSSO, P.; BRASEL, J. A. Malnutrition and cellular growth in the brain. **Bibl**

Nutr Dieta, n. 17, p. 60-68, 1972.

WISLOFF, U.; LOENNECHEN, J. P.; CURRIE, S.; SMITH, G. L. *et al.* Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, 54, n. 1, p. 162-174, Apr 2002.

XIAO, Q.; YE, S. The genetics of epigenetics: is there a link with cardiovascular disease. **Heart**, 97, n. 2, p. 96-97, Jan 2011.

YANG, H.; ROBERTS, L. J.; SHI, M. J.; ZHOU, L. C. *et al.* Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circ Res**, 95, n. 11, p. 1075-1081, Nov 26 2004.

YU, W.; ZHOU, H. F.; LIN, R. B.; FU, Y. C. *et al.* Shortterm calorie restriction activates SIRT14 and 7 in cardiomyocytes in vivo and in vitro. **Mol Med Rep**, 9, n. 4, p. 1218-1224, Apr 2014.

ZHANG, B.; KAWACHI, E.; MIURA, S.; UEHARA, Y. *et al.* Therapeutic approaches to the regulation of metabolism of high-density lipoprotein. Novel HDL-directed pharmacological intervention and exercise. **Circ J**, 77, n. 11, p. 2651-2663, 2013.

ZHAO, H.; LIU, Y. J.; LIU, Z. R.; TANG, D. D. *et al.* Role of mitochondrial dysfunction in renal fibrosis promoted by hypochlorite-modified albumin in a remnant kidney model and protective effects of antioxidant peptide SS-31. **Eur J Pharmacol**, 804, p. 57-67, Jun 5 2017.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **Int J Mol Med**, 44, n. 1, p. 3-15, Jul 2019.

ZHOU, X.; YANG, G.; DAVIS, C. A.; DOI, S. Q. *et al.* Hydrogen peroxide mediates FK506-induced cytotoxicity in renal cells. **Kidney Int**, 65, n. 1, p. 139-147, Jan 2004.

ZUHL, M. Tips for Monitoring Aerobic Exercise Intensity. ACSM 2020.

APÊNDICE A – MODERATE OFFSPRING EXERCISE OFFSETS THE HARMFUL EFFECTS OF MATERNAL PROTEIN DEPRIVATION ON MITOCHONDRIAL FUNCTION AND OXIDATIVE BALANCE BY MODULATING SIRTUINS

ARTICLE IN PRESS

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (xxxx) xxx, xxx



Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcd



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

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

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

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

^c Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Colegiado de Educação Física, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, Brazil

Received 16 July 2020; received in revised form 20 December 2020; accepted 8 January 2021

Handling Editor: A. Siani

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/n55608-680 – 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.numecd.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.numecd.2021.01.006>

Introduction

Over the last decades, the Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD) hypothesis argues that adverse conditions during critical periods of development, early pre-natal and post-natal development predispose the organism to later noncommunicable diseases [1,2]. The studies propose that a poor maternal nutrition promotes offspring changes in molecular, functional and structural phenotypes, providing survival-related adaptations that would be detrimental over the life [2–5]. In this context, studies have demonstrated that long-term survivors of early malnutrition, especially protein deprivation, can sustain permanent systemic dysfunctions in the heart and cardiovascular-related tissues [6], as evidenced by coronary heart disease [7], elevated blood pressure [8], changes in the cardiac morphology [9], endothelial dysfunction [10] as well as autonomic impairments [11].

Among the molecular offspring outcomes induced by a maternal protein restriction, our laboratory has pointed to the oxidative stress as a major driver of damage to cardiovascular related tissues (heart, kidney, and brainstem), inducing cardiometabolic changes, glomerular modifications, and sympathetic over excitation [12–17]. As a common biochemical outcome/trigger described in cardiovascular diseases, the oxidative stress is characterized as the chronic imbalance between production and removal of the reactive oxygen species (ROS), which has the mitochondria as their major intracellular source [18–20], therefore, an important target in the oxidative stress-related disease studies.

Conversely, moderate-intensity exercise has been widely used in the enhancement of the cardiovascular function as well as a coadjuvant in the treatment of cardiac diseases and their risk factors [21–24]. The molecular network-related exercise benefits rely on a plenty of downstream pathways, underlying the exercise protocol used (i.e., type of exercise, intensity, volume, and periodization) [25–27], wherein greater resilience to oxidative stress and the enhancement of the mitochondrial function and dynamics (e.g., ATP synthesis, Calcium homeostasis, and redox status) stand out among the moderate-intensity exercise-induced cellular improvements [28–31]. Together, nutrition and physical exercise could modulate mitochondria function by regulating epigenetic processes, such as DNA methylation and post-translational modifications [32,33], wherein deacetylase enzymes related to NAD⁺/NADH pool (sirtuins) play a crucial role in the cardiac metabolism [34–36]. The sirtuins (SIRT) are a family enzyme comprising seven members (SIRT1–SIRT7), where SIRT1 (located in both the cytoplasm and the nucleus) along with SIRT3 (located in the mitochondria) is the most studied in the cellular resilience and mitochondria-related cellular functions, respectively [37].

In the fight against the harms of maternal low-protein diet, studies have described that physical exercise can counteract/attenuate offspring impairments on the ontogeny reflex, immunity system, muscle composition and maximal oxygen capacity [38–41]; however, the

effects of the offspring moderate-intensity exercise on the cardiac metabolism are unknown. As the exercise protocol is age-dependent, and an active lifestyle is encouraged since the beginning of the life [42,43], we hypothesize that moderate-intensity exercise during childhood might protect male protein-restricted offspring from cardiac impairments in the oxidative balance and mitochondrial metabolism, hence holding exercise-induced SIRT modulation as a potential target in cardiac metabolism of malnourished subjects.

Methods

Animals and experimental design

All experiments followed the guidelines of the Institutional Ethics Committee for Animal Research (approval protocol no. 23076.017,809/2014–04), complying with the “Principles of Laboratory Animal Care” published by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Female Wistar rats ($n = 8$), aged between 80 and 90 days of life, were mated in a ratio of 2 to 1 male and had their vaginal smear checked daily until the appearance of spermatozoa, which was considered as the day of conception. Pregnant rats were randomly divided into two groups, based on the protein amounts of the diet to be received: I) control group, that received a normoprotein diet based on 17% casein, $n = 4$; and II) undernourished group, receiving a low-protein diet based on 8% casein, $n = 4$. Prepared at the Laboratory of Dietetic Technic at the Academic Center of Vitoria – the Federal University of Pernambuco-UFPE, both diets had the same energetic value and were offered throughout the gestation and lactation period, as described previously [15,16,44].

Twenty-four hours after delivery, the litters were standardized to eight pups each, and female pups maintained only to keep the litters at a constant size without adoption. To avoid any variability, at weaning, only four male animals from each litter were chosen to continue in the study, when also started to be fed with a laboratory chow (Labina; Purina Agriband, Brazil). At 30 days of age, offspring from mothers that had received either low-protein or normoprotein diet were further divided into two groups, this time based on the presence or absence of a moderate physical training regimen. A total of four groups ($n = 8$, each) were formed, wherein the first letter represents the maternal diet offered during the gestational and lactation period and the second letter the exercise status of the offspring. Thus: I) NS: maternal normoprotein diet and sedentary offspring; II) NT: maternal normoprotein diet and trained offspring; III) LS: maternal low-protein diet and sedentary offspring; and IV) LT: maternal low-protein diet and trained offspring.

Treadmill exercise

Animals located in the trained groups underwent moderate physical training based on the indirect maximal oxygen

consumption [42]. First, the animals passed for an adaptation to the training apparatus (5 days on a treadmill-IPXO INBRAMED, Porto Alegre, Brazil), then, a graded exercise test was applied to assess their maximal running capacity. Forty-eight hours later, the animals started their physical training program, which consisted of running 60 min per day, 5 days per week, during 4 weeks (5 min warm-up, 0.3–0.4 km/h; 50 min main speed, 50% of their maximal running capacity; and 5 min cool-down, 0.3–0.4 km/h). The maximal running capacity was assessed weekly, and it was used to adjust the treadmill speed throughout the study.

All animals completed the experimental protocol, and those from the nonexercised groups were placed on the treadmill for the same time as the exercised animals, but the treadmill remained off.

Serum total cholesterol

Forty-eight hours after the last exercise session, all rats were killed by decapitation, and blood samples were collected in sterile tubes and centrifuged at $903 \times g$ for 5 min to obtain the serum. Then, using an automatic analyzer for clinical chemistry (Pioway, model PW2280, China), serum samples were used in the total cholesterol and triglycerides assays according to the manufacturer's protocol (Biotecnic, MG, Brazil).

Heart preparation for mitochondrial analysis

Once atria and right ventricle were removed, the left ventricle (LV) was immediately minced and homogenized in an ice-cold mitochondrial isolation buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 4 mM HEPES, 2 mM taurine and 0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid, pH 7.4, using a potter- Elvehjem pestle and glass tube connected to a homogenizer (IKA® RW20 digital). Homogenates were centrifuged for 5 min at $1180 \times g$ at 4 °C and the resulting supernatants were additionally centrifuged for 10 min at $12,470 \times g$ and 4 °C. The pellets remaining (isolated mitochondria) were resuspended in a respiration buffer (RB) consisting of 120 mM KCl, 4 mM HEPES, 5 mM K_2HPO_4 and 0.2% BSA (w/v), pH 7.4, and kept on ice until the assays [13,45].

Measurement of mitochondrial respiration

This assay is based on the mitochondrial capacity to consume O_2 in response to the electron coupling-related proton current (Chance and Williams, 1955; Brand and Nicholls, 2011). Here, we monitored the O_2 consumption, under different conditions by using a 600 SL chamber connected to a Clark-type oxygen electrode at a temperature of 28 °C (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, United Kingdom) [13]. Initially, mitochondria were incubated in RB (1 mg protein/mL) containing only Complex I substrates (10 mM glutamate and 0.4 mM malate), which restricts the mitochondria to minimal consumption of O_2 due to the scarcity of ADP in the assay (basal state). Thereafter, ATP synthesis was stimulated by adding

0.5 mM ADP (state 3/ADP-stimulated), at which time, mitochondria use O_2 as the final electron acceptor while phosphorylating ADP to ATP via ATP synthase activation. State 3 was ended by the addition of 1.2 mM oligomycin (resting state) to decrease O_2 consumption through inhibition of ATP synthase activity. The last state evaluated was the uncoupled state, measured by adding 5 mM carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), a protonophore that increases the velocity of O_2 consumption by uncoupling the mitochondria. Additionally, ADP-stimulated/resting states were used to assess the mitochondrial respiratory control ratio (RCR), a classical indicator of mitochondrial "health" [46].

Measurement of mitochondrial reactive species production

ROS production was assessed by the dihydro dichloro-fluorescein diacetate (H_2DCF -DA) method [13]. Briefly, 0.1 mg of mitochondria were incubated in RB with complex I substrates and 5 mM (H_2DCF -DA), which in the presence of reactive species form a product that fluoresces at 485 nm excitation and 530 nm emission. The reaction was followed by gentle shaking for 8 min using a FLUOstar OMEGA spectrophotometer (BMG Labtech, United States) at 28 °C, and the results were expressed as a percentage of H_2DCF -DA fluorescence yielded.

Measurement of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening

The MPTP was determined as described previously [47]. In a concentration of 0.100 mg/mL, isolated mitochondria along with complex I substrates were added into a swelling buffer that contained (in mmol/L) 120 KCl, 4 HEPES, 5 12 KH_2PO_4 and BSA (0.2%) (pH 7.4). Then, the MPTP was induced by a $CaCl_2$ titration, wherein the absorbance decay followed at 520 nm (0.50 μ mol/L to 100 μ mol/L).

mRNA evaluation

The total RNA was extracted from LV using TRIzol reagent and the guanidine isothiocyanate method [32], according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then, RNA pellets were washed in 75% ethanol and centrifuged at $7500 \times g$ for 5 min at 4 °C, air-dried, and dissolved in DEPC-treated ultrapure water. RNA quantification was performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, US), and the purity was assessed using the 260/280 nm absorbance ratio [33]. Thereafter, real-time polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed for β 2-microglobulin (β 2M), SIRT1 and SIRT3 genes using the SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) [34]. Samples ($n = 5$ per group) were processed in duplicate, and the cycle threshold (Ct) values of each targeted gene were normalized to the β 2M Ct determined in the identical sample. Relative mRNA expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [35] (Table 1).

Table 1 Primers used for PCR analysis.

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
SIRT1	CTGTTTCCTGTGGGATACCTGACT	ATCGAACATGGCTTGAGGATCT
SIRT3	GGCACTACAGGCCCAATGTC	TCTCTCAAGCCCCGTCGATGT
β2M	TGACCGTGATCTTTCTGCTG	ACTTGAATTGGGGAGCTTTCTG

SIRT1: sirtuin 1; SIRT3: sirtuin 3; and β2M: beta 2-microglobulin.

Heart preparation for biochemical analysis

Left ventricle was completely homogenized in cold buffer (50 mM-TRIS, 1 mM-EDTA (pH 7.4), 1 mM-sodium orthovanadate and 1.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF) with a sampling homogenizer (Tecnal, Sao Paulo, Brazil). Ventricular homogenates, no pulling needed, were centrifuged at $1180 \times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatants stored at –80 °C. Protein concentration was determined in the supernatant by Bradford's method [48], and then used for the following biochemical analyses.

Western blot analysis

Electrophoresis was performed in resolving acrylamide SDS gels (8–12%) (BioRad) followed by transference onto 0.2 μm pore size nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U). Then, the membranes were incubated with the appropriate primary antibody, SIRT1 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, inc. B-7: sc-74465, Portland, Oregon, United States), SIRT3 (1:1000) (Boster BioTechnology: A01061-1, Pleasanton, CA, United States), and acetylated lysine (1:1000) (ABIN3181587, Limerick, Pennsylvania, United States) at 4 °C overnight. Membranes were washed three times and incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology) at RT for 2 h, washed three times again, and exposed to the ECL solution (Pierce®ECL Western Blotting substrate – Thermo Scientific). The gel transfer efficiency was verified by reversible Ponceau S staining (da Silva 2015) and the band intensities measured using ImageJ 1.51f (NIH, Maryland, USA).

Evaluation of malondialdehyde production

A total of 0.2 mg/ml LV protein supernatant was used to measure the malondialdehyde (MDA) product following the reaction with thiobarbituric acid (TBA) [49]. In this assay, MDA or MDA-like substances produce a pink pigment with maximum absorption at 535 nm. The reaction was performed by the sequential addition of 30% trichloroacetic acid (TCA) and Tris–HCl (3 mM) to the samples followed by centrifugation at $2500 \times g$ for 10 min. Then, the supernatant was transferred to a tube, mixed with the same volume of 0.8% TBA (v/v), and boiled for 30 min. The absorbance of the organic phase was read at 535 nm using a spectrophotometer, and the results expressed as nmol/mg protein [50].

Evaluation of protein oxidation

The protein carbonyl content is the major marker for oxidative damage to protein, and it was measured in

accordance with Reznick and Packer (1994). Briefly, 30% TCA was added to the sample on ice, mixed and centrifuged for 15 min at $1180 \times g$. The pellet was suspended in 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and immediately incubated in a dark room for 1 h with shaking every 15 min. Then, samples were centrifuged, washed three times with ethyl/acetate buffer, and the pellet suspended in 6 M guanidine hydrochloride followed by incubation for 5 min in a water bath at 37 °C. Absorbance was read at 370 nm and the results expressed as μmol/mg protein [51,52].

Measurement of superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activity

The determination of total superoxide dismutase (SOD) enzyme activity (t-SOD) was performed according to the method described for Misra and Fridovich [53]. LV supernatants (0.1 mg/ml) were incubated with 880 μl sodium carbonate (0.05%, pH 10.2, 0.1 mM EDTA) at 37 °C, and the reaction started by 30 mM epinephrine (in 0.05% acetic acid). The kinetics of the inhibition of adrenalin auto-oxidation was monitored for 90 s at 480 nm and its activity expressed as U/mg protein [53].

Measurement of catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity

CAT activity was measured according to the method described by Aebi (1984). The assay consisted of 50 mM-phosphate buffers (pH 7.0), 0.300 mM H₂O₂ and 0.3 mg/ml LV sample. The rate constant of the enzyme was determined by measuring the absorbance change at 240 nm throughout 4 min at 30 °C. CAT activity is expressed as U/mg protein [54].

Measurement of glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.18) activity

Glutathione-S-Transferase (GST) activity was measured as described previously by Habig (1974). First, 200 μg of LV protein supernatant was added to 0.1 M-phosphate buffer (pH 6.5) containing 1 mM-EDTA at 30 °C and the assay was initiated with 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene plus 1 mM-GSH. Then, the formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored at 340 nm absorbance, and the enzymatic activity is defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 μmol 2,4-dinitrophenyl S-glutathione [55,56].

Measurement of citrate synthase (EC 2.3.3.16) activity

Widely used as a marker of oxidative metabolism, CS activity was determined as described previously [57], wherein 0.3 mg/ml of sample was incubated in a reaction mixture containing (in mM) 100 Tris–HCl (pH 8.1), 1

MgCl₂, 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ($\epsilon = 13.6 \mu\text{mol ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 0.1 acetyl-CoA, and 0.5 oxaloacetate at 25 °C. The rate of the absorbance change at 412 nm was monitored over 3 min, and the results are expressed as U/mg protein [52].

Measurement of redox state (GSH and GSSG)

The levels of glutathione reduced (GSH) were measured in a milieu containing 0.1 M phosphate buffer along with 5 mM-EDTA (pH 8.0), and 0.1 mg of supernatant protein. Then, the assays were incubated with 1 mg/ml of o-phthalaldehyde (OPT) at room temperature for 15 min and the fluorescence intensity assessed at 350 excitation and 420 nm emission wavelengths, respectively.

To determine the glutathione oxidized (GSSG) levels, 0.1 mg protein of the samples was incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min at RT followed by the addition of 0.1 M NaOH buffer up to 0.2 ml. Similarly to GSH, aliquots were incubated with OPT and the fluorescence intensity assessed at the same settings. Both GSH and GSSG values were compared to standard curves and the redox state determined as the ratio of GSH/GSSG [58,59].

Measurement of total sulfhydryl groups

The quantification of sulfhydryls (SH) was based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, as described previously [60]. Briefly, an aliquot of the LV supernatant (200 μg of protein) was incubated in the dark with 30 μL of 10 mM DTNB and a final volume of 1 ml was obtained with the addition of extraction buffer (pH 7.4). The absorbance was read at 412 nm and the results expressed as mmol/mg protein.

Measurement of redox state (NAD⁺ and NADH)

The NAD⁺ and NADH levels were determined by the incubation of 100 μg of protein samples with a 50 mM-TRIS buffer (pH 7.4) at room temperature for 1 min. Absorbances were read at 260 nm and 340 nm, for NAD⁺ and NADH, respectively, and the results expressed as nmol/mg protein based on the standard curves with known concentrations. The NAD⁺ and NADH redox states were determined by the ratio of NAD⁺/NADH as described previously [61].

Drugs and reagents

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

Statistical analysis

Analyses were performed using the GraphPad Prism software, version 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). For nonparametric data, the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test were used, while parametric data were analyzed via two-way ANOVA followed by the Tukey post-test. The values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and comparisons were considered as statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Serum lipids

Our results show that the maternal low-protein diet had no effects on either the cholesterol or triglyceride content. However, animals that underwent moderate-intensity exercise had a decrease in the triglycerides of 35% (NS: 201.77 ± 18.16 vs NT: 130.32 ± 16.72 , $p = 0.031$) and 40% (LS: 202.59 ± 19.25 vs LT: 122.10 ± 11.58 , $p = 0.013$), normoprotein, and low protein, respectively. Additionally, the cholesterol levels decreased around 10% in both normoprotein and low-protein animals, however, these findings were not statistically supported (Table 2).

Effect of exercise on oxidative metabolism

To confirm the training and evaluate the metabolism, we measured the citrate synthase (CS) activity in the soleus and EDL muscles. Citrate synthase condenses the oxaloacetate and acetyl coenzyme-A to form citrate in the citric acid cycle, being an important marker of the oxidative cellular capacity [57]. Thus, its activity was also measured in skeletal muscles involved in the treadmill exercise. The results showed that exercise increased CS activity in soleus (NS: 22.37 ± 1.29 vs NT: 31.66 ± 1.36 , $p = 0.0005$; LS: 13.53 ± 0.89 vs LT: 21.28 ± 1.24 , $p = 0.0022$) (Fig. 1A) and EDL (NS: 0.69 ± 0.14 vs NT: 1.89 ± 0.11 , $p = 0.012$; LS: 0.79 ± 0.23 vs LT: 1.69 ± 0.22 , $p = 0.022$) (Fig. 1B) of the NT and LT animals when compared with their respective controls. In the cardiac tissue, our results show that maternal low-protein diet decreases the CS activity (NS: 1.04 ± 0.07 vs LS: 0.34 ± 0.11 , $p = 0.03$) (Fig. 1C), which is accompanied by a decrease in the NAD⁺ (NS: 19.68 ± 0.79 vs LS: 11.70 ± 0.21 , $p < 0.0001$) and NADH (NS: 6.50 ± 1.00 vs LS: 1.96 ± 0.19 , $p < 0.0001$) levels, elevating the NAD⁺/NADH ratio (NS: 2.86 ± 0.47 vs LS: 5.40 ± 0.89 , $p < 0.0001$) (Fig. 1D–1F). In contrast, the physical exercise was capable

Table 2 Serum cholesterol and triglycerides in the male rat offspring of mothers receiving either a low-protein diet or normal diet during the gestational and lactation periods, and underwent or not to an exercise program during 4 weeks starting at 30 days of life.

	NS	NT	LS	LT
Cholesterol	88.32 ± 3.78	80.96 ± 5.50	89.65 ± 7.85	79.57 ± 4.71
Triglycerides	201.77 ± 18.16	$130.32 \pm 16.72^*$	202.59 ± 19.25	$122.10 \pm 11.58^*$

NS) maternal normoprotein diet plus sedentary offspring; NT) maternal normoprotein diet plus trained offspring; LS) maternal low-protein diet plus sedentary offspring; LT) maternal low-protein diet plus trained offspring. Data are shown as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ indicates the difference to sedentary group with the same nutritional background; N=6 per group.

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.numecd.2021.01.006>

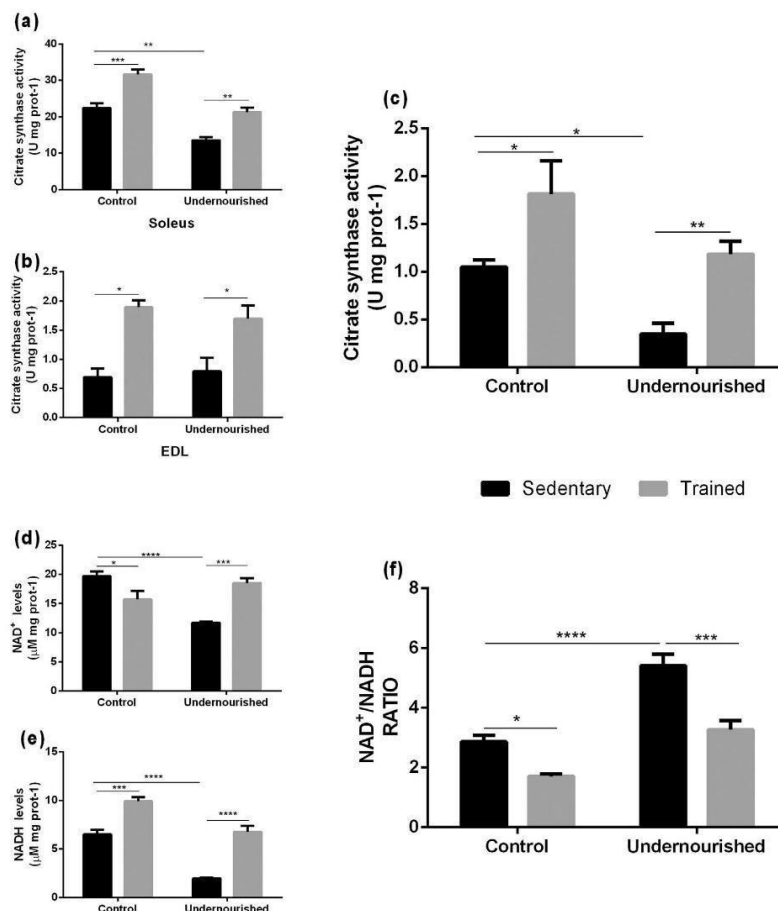


Figure 1 Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on citrate synthase activity in male offspring: A) soleus and B) extensor digitorum longus – EDL muscles; and C) heart. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$; N = 6 per group.

to offset detriments in the cardiac metabolism caused by the protein undernutrition. The physical training increased the citrate synthase activity (LS: 0.34 ± 0.11 vs LT: 1.18 ± 0.13 , $p = 0.005$) (Fig. 1C), the NAD⁺ (LS: 11.70 ± 0.21 vs LT: 18.54 ± 0.83 , $p = 0.0005$) and NADH (LS: 1.89 ± 0.20 vs LT: 8.56 ± 1.00 , $p < 0.0001$) levels (Fig. 1D and 1E, respectively), while reestablished the NAD⁺/NADH ratio (LS: 5.40 ± 0.89 vs LT: 3.26 ± 0.69 , $p = 0.0003$). Similar changes were observed in the animals from the normoprotein diet in the citrate synthase activity (NS: 1.04 ± 0.07 vs NT: 1.81 ± 0.34 , $p = 0.025$) (Fig. 1C), NAD⁺ (NS: 19.68 ± 0.79 vs NT: 15.71 ± 1.46 , $p = 0.038$) (Fig. 1E) and NAD⁺/NADH ratio (NS vs NT, $p = 0.041$) (Fig. 1F).

Mitochondrial bioenergetics

The mitochondrial bioenergetics is essential to cellular survival, wherein alterations in its function have been associated with several diseases. Our results demonstrate that low-protein animals had higher consumption of oxygen in the basal (NS: 2.78 ± 0.25 vs LS: 5.17 ± 0.78 , $p = 0.013$) and resting states (NS: 2.18 ± 0.12 vs LS: 5.62 ± 0.75 , $p = 0.0004$) (Fig. 2A), while lowered the amounts of O₂ consumed in the ADP-stimulated state (NS: 17.26 ± 1.4 vs LS: 10.24 ± 1.07 , $p = 0.022$) and uncoupling state (NS: 8.95 ± 0.3 vs LS: 4.81 ± 0.54 , $p = 0.001$), culminating in a decrease of the RCR (NS: 7.91 ± 0.49 vs LS: 1.89 ± 0.20 , $p < 0.0001$). As a mitochondrial enhancer, the

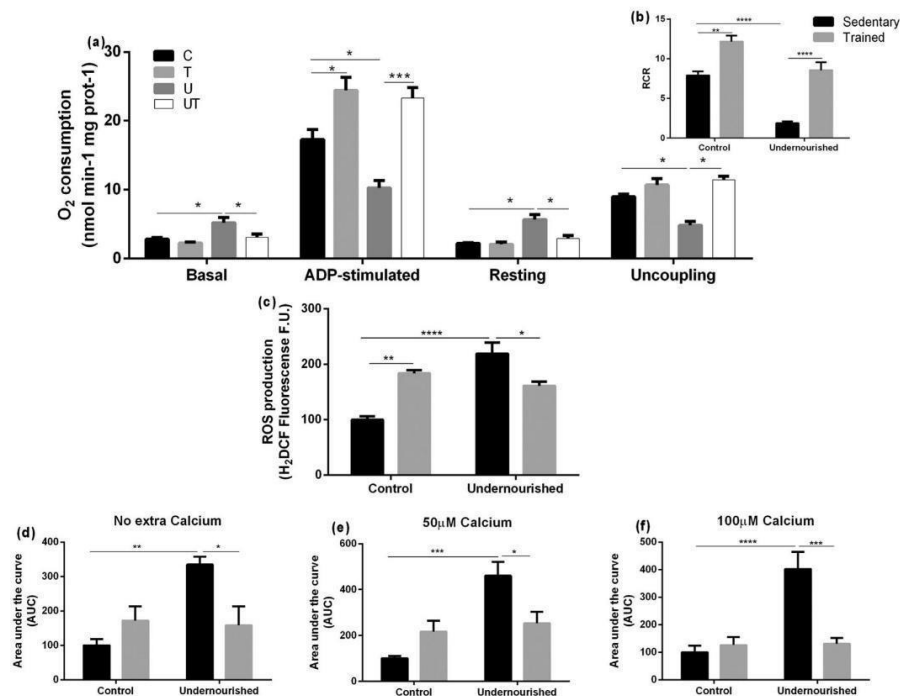


Figure 2 Effect of maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood on the cardiac mitochondria: A) mitochondrial respiratory states; B) respiratory control ratio – RCR; C) production of reactive species – ROS; D), E) and F) mitochondrial permeability transition pore opening – mPTP in 0, 50 μ M, and 100 μ M calcium concentrations. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * p < 0.05; **** p < 0.0001; N = 5 per group.

exercise demonstrates to increase the O_2 consumption in most respiratory parameters regardless of the nutritional status (ADP-stimulated: NS: 17.26 ± 1.4 vs NT: 24.42 ± 1.90 , $p = 0.019$ and LS: 10.24 ± 1.07 vs LT: 23.30 ± 1.49 , $p < 0.0001$) (uncoupling state: LS: 4.81 ± 0.54 vs LT: 11.40 ± 0.51 , $p < 0.0001$) (RCR-NS: 7.91 ± 0.49 vs NT: 12.16 ± 0.74 , $p = 0.022$; LS: 1.89 ± 0.20 vs LT: 8.56 ± 1.00 , $p < 0.0001$). The changes in the respiratory states culminated in a deep decrease in the RCR in the protein restricted animals (NS: 7.91 ± 0.49 vs LS: 1.89 ± 0.20 , $p < 0.0001$), which restored their mitochondrial capacity following 4 weeks of moderate-intensity exercise (LS: 1.89 ± 0.20 vs LT: 8.56 ± 1.00 , $p < 0.0001$).

Impairments in the mitochondria O_2 consumption may lead to ROS overproduction and the opening of the mitochondrial permeability transition pore-induced mitochondrial swelling. Our results showed that mitochondria from the LS group increased their ROS production (NS: 100.00 ± 5.92 vs LS: 219.19 ± 19.82 , $p < 0.0001$) (Fig. 2C), which was followed by a lower resistance to calcium in all conditions (0/endogenous- NS: 100.00 ± 18.24 vs LS: 334.48 ± 22.76 , $p = 0.004$; 50 μ mol: NS: 100.00 ± 10.48 vs LS: 460.52 ± 60.05 , $p = 0.0003$; 100 μ mol: NS:

100.00 ± 23.41 vs LS: 402.17 ± 62.44 , $p = 0.0001$) (Fig. 2D–2F). Interestingly, in these parameters, the exercise provided changes only in the low-protein animals by decreasing the ROS production (LS: 219.18 ± 19.82 vs LT: 161.199 ± 7.44 , $p = 0.030$) (Fig. 2C) and increasing the resistance to the calcium-induced mitochondrial permeability transition pore opening (0/endogenous- LS: 334.48 ± 22.76 vs LT: 158.62 ± 54.12 , $p = 0.018$; 50 μ mol: LS: 460.52 ± 60.05 vs LT: 253.21 ± 49.77 , $p = 0.027$; 100 μ mol: LS: 402.17 ± 62.44 vs LT: 130.43 ± 21.00 , $p = 0.0002$) (Fig. 2D–2F).

Oxidative stress biomarkers

Lipid and protein oxidation were made to assess the degree of oxidative stress in the hearts of each group (Fig. 3). The results show that sedentary low-protein (LS) animals have twice the amount of damage in the lipid (NS: 33.27 ± 5.01 vs LS: 67.13 ± 5.68 , $p < 0.0001$) and protein (NS: 3.01 ± 0.48 vs LS: 6.32 ± 0.26 , $p < 0.0001$) macromolecules, than NS group, Fig. 3A and 3B, respectively. Similarly to ROS and mPTP, no changes in the oxidative biomarkers were observed in animals that were normally

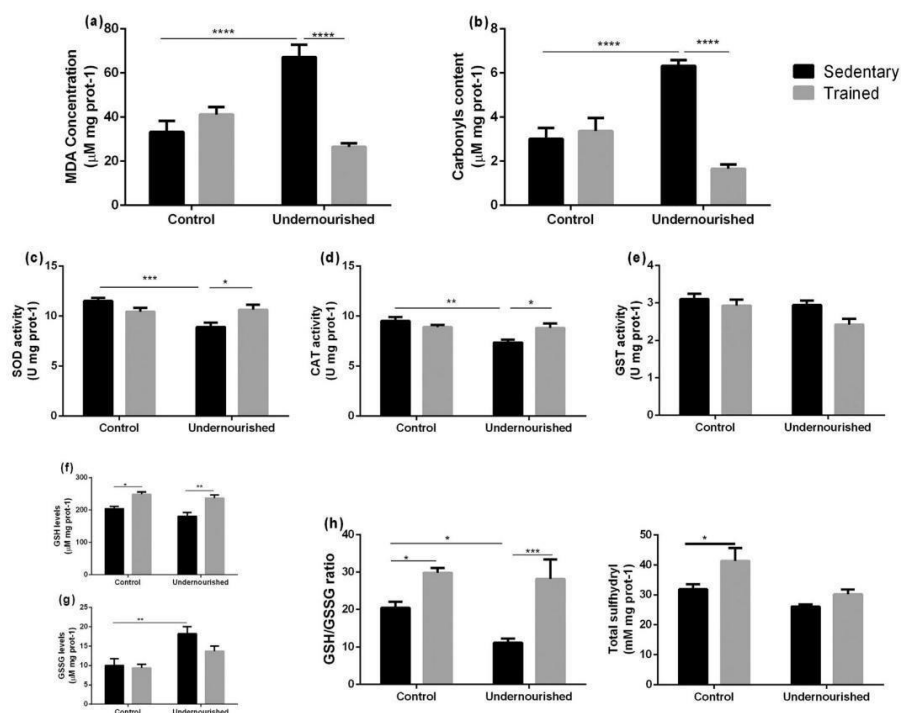


Figure 3 Cardiac oxidative balance in animals that underwent a maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood. Oxidative damage to A) lipids (malondialdehyde – MDA) and B) proteins (carbonyl content). The activity of antioxidant enzymes: C) superoxide dismutase (SOD); D) catalase (CAT) and E) glutathione-S-transferase (GST). Nonenzymatic antioxidant compounds: F) glutathione reduced (GSH); G) glutathione oxidized (GSSG); H) redox state (GSH/GSSG); and I) sulfhydryl content. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. ****p < 0.0001; N = 6–8 per group.

fed, however, in undernourished animals, the exercise was able to bring these parameters back toward to normal (Fig. 3A and 3B), highlighting the protective effects of the moderate-intensity exercise training to the heart of the low-protein animals.

Enzymatic antioxidant system

The antioxidant enzymes SOD, CAT, and GST are responsible for the protection of the cells from oxidative damage caused by ROS formation [62], and we and others have shown their significant reduction following a maternal low protein diet [16,63]. Herein, it is notable that the increase in the oxidative biomarkers in the undernourished animals correlates with the reduction in the SOD (NS: 11.51 ± 0.30 vs LS: 8.90 ± 0.43 , $p = 0.0004$) and CAT (NS: 9.52 ± 0.40 vs LS: 7.35 ± 0.27 , $p = 0.0012$) enzymatic activity, Fig. 3C and 3D, respectively. If the low-protein animals underwent the physical training, nevertheless, the enzymatic activity of SOD (LS: 8.90 ± 0.43 vs LT: 10.64 ± 0.48 , $p = 0.031$) and CAT (LS: 7.35 ± 0.27 vs LT: 8.81 ± 0.45 , $p = 0.05$) would be

increased, and similar activities of the control animals were displayed (Fig. 3C and 3D).

Nonenzymatic antioxidant system

In addition to the enzymatic system, ROS-induced damage is also managed by nonenzymatic ways, wherein GSH and the thiol group represent the two major compounds involved in the oxidative stress reduction. The measurement of these anti-oxidant compounds (Fig. 3F and 3I) shows that moderate-intensity exercise enhances the nonenzymatic antioxidant capacity by up-regulating GSH levels despite the nutritional background (NS: 204.43 ± 7.31 vs NT: 248.89 ± 7.43 , $p = 0.012$ and LS: 180.34 ± 11.92 vs LT: 237.01 ± 9.92 , $p = 0.001$) (Fig. 3F), while thiol groups increased only in the normal fed animals (NS: 31.86 ± 1.67 vs NT 41.37 ± 4.22 , $p = 0.037$) (Fig. 3I). Additionally, the exercise increased the redox state (GSH/GSSG) in both nutritional conditions (NS: 20.43 ± 1.61 vs NT: 29.81 ± 1.21 , $p = 0.048$ and LS: 11.12 ± 1.13 vs LT: 28.19 ± 5.14 , $p = 0.0003$), offsetting the

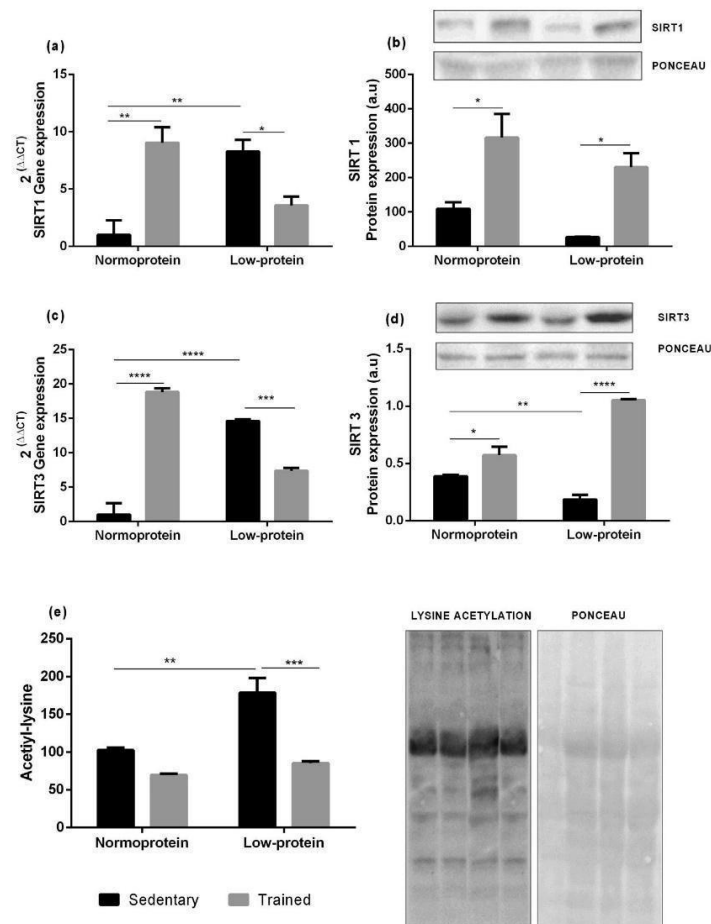


Figure 4 Maternal low-protein diet and moderate physical training during childhood as modulators of the cardiac sirtuins (SIRT): A) gene and B) protein expressions of SIRT1; C) gene, and D) protein expressions of SIRT3; and E) content of acetylation-lysine. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; N = 5 per group.

low-protein outcomes (NS: 20.43 ± 1.61 vs LS: 11.12 ± 1.13 , $p = 0.041$) in the GSH/GSSH ratio (Fig. 3H).

Regulation of mitochondrial function by lysine acetylation and sirtuins 1-3

Sirtuins have been shown to modulate the mitochondrial function and oxidative stress by regulating the levels of protein acetylation. Our results show that both exercise and maternal low-protein diet, alone, up-regulate the gene expression of sirtuin 1 (NS: 1.00 ± 1.26 vs NT: 9.04 ± 1.35 , $p = 0.0014$; NS: 1.00 ± 1.26 vs LS: 8.26 ± 1.034 , $p = 0.0032$) (Fig. 4A) and sirtuin 3 (NS: 1.00 ± 1.68 vs NT: 18.82 ± 0.54 , $p < 0.0001$; NS: 1.00 ± 1.68 vs LS:

14.61 ± 0.27 , $p < 0.0001$) (Fig. 4C). However, in the undernourished animals, the exercise reduced the SIRT1/3 gene expressions (Fig. 4A and 4C).

When the protein content was evaluated, we noticed that only normal fed animals were in accordance with their gene expressions. As demonstrated, in Fig. 4B; D, the SIRTs were increased in the normal trained groups (SIRT 1- NS: 109.18 ± 19.47 vs NT: 316.47 ± 68.91 , $p = 0.025$) and (SIRT3- NS: 0.38 ± 0.01 vs NT: 0.57 ± 0.07 , $p = 0.016$), while, in the undernourished animals, the SIRT contents diverged from their gene expressions (Fig. 4A–4D). Together, the modulations in gene and protein expressions culminated in a hyper-acetylation in the lysine residue in the low-protein sedentary animals when compared to the

control rats (NS: 102.67 ± 2.86 vs LS: 178.35 ± 20.07 , $p = 0.002$) (Fig. 4E), which was down-regulated by the exercise training.

Discussion

Epidemiologic and experimental data indicate that a poor maternal diet during a critical period of development, encompassing both gestation and lactation, increases the occurrence of cardiovascular and other noninfectious diseases in the offspring adulthood [64–66]. The present study demonstrates how maternal protein restriction affects mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in male offspring hearts, wherein the opening of the mitochondrial permeability transition pore suggests a disruption in the mitochondrial integrity. Additionally, our work shows the early exercise as a reliable intervention in the reestablishment of the cardiometabolic “health” by modulating SIRT-related epigenetic process in male pups from protein restricted mothers.

The developmental origins of health and disease hypothesis propose that the insult during fetal and early postnatal development outcomes in survival adaptations [67], our data suggest that the sustained decrease in the Krebs cycle along with the lower NADH mitochondria supply would not provide to the heart the energy required to function correctly. As a countermeasure strategy, the exercise demonstrated to be beneficial for the heart's oxidative metabolism, especially to the undernourished animals, by doubling their CS activity and restoring the NAD⁺/NADH ratio.

Regarding mitochondria, the RCR demonstrates a cogent impairment in the hearts of the undernourished animals. In the failing heart, the mitochondrial inefficiency represents a critical factor for the development of the cardiac disease, wherein the lack of ATP disallow the myocardium to work correctly [68,69]. Here, the highest O₂ consumption in the basal state indicates a mitochondrial electron uncoupling by the undernourished group. Additionally, state 3 shows a reduced phosphorylate capacity in the protein-restricted animals, which following ADP-stimulation consumed twice more oxygen, while control animals increased their consumption over five times. Similar behaviors were verified in the two states remaining, wherein the inhibition of the ATP synthase, as well as the enhancement of the membrane potential, promoted minimal or even different responses in the LS group. In this context, studies from our laboratory demonstrated that a maternal low-protein diet disrupts the mitochondrial electron chain coupling in cardiovascular-related tissues, regardless of age [13,15]. Thus, we believe that a common outcome of this nutritional insult is the mitochondrial inability to maintain their electron flow throughout the complexes into the electron transport chain (ETC). In the LT group, nevertheless, our data show that only four weeks of exercise reestablished all the mitochondrial bioenergetics parameters evaluated. Interestingly, in state 3, the LT group had similar oxygen consumption of the NT group, suggesting that, despite the protein restriction-induced impairments, the

undernourished animals might be more sensible to phosphate pool-related energy fluctuations.

Furthermore, the overproduction of ROS by the undernourished animals might result from the mitochondrial electron leakage through ETC, which is a described outcome into uncoupled mitochondria and is also related to the opening of MPTP [70]. Our undernourished animals confirm the relations above by demonstrating the MPTP-induced mitochondrial swelling, even in the absence of extra calcium. Additionally, as mitochondrion swells under calcium overload, and we found similar swellings magnitude in the 50 and 100 μ M calcium concentrations, the maternal low-protein diet may have also disturbed the cellular calcium homeostasis, which up-regulates mitochondrial ROS production beyond the traditional complex I and III sites [71,72], affecting redox signaling pathways such as cell proliferation, oxygen sensing, apoptosis, metalloproteins, and transcription factors [73].

Under a variety of physiological conditions (e.g., growth, survival, proliferation), the increase in the ROS production, especially hydrogen peroxide, has been described [74,75]. Thus, in normal-diet-fed trained animals, their higher amounts represent a biological adaptive event [76]. At the same time, maternal protein restriction triggers an extensive damage to offspring biomolecules, wherein the decrease in SOD activity may rise the levels of peroxynitrite (superoxide + nitric oxide), a relative strong oxidant that can react with thiols, amino acidic residues, and transition metal centers, and, in worst scenario, produce hydroxyl radicals [77]. It has also been described that peroxynitrite can inactivate a plethora of enzymes, including some related to mitochondria bioenergetics, but we did not investigate these relations to our findings. At the moment, our findings indicate that the overall decrease in the antioxidant capacity (SOD, CAT, and redox status) disturbs cardiovascular functions by impairing biomolecules integrity, as described previously [78–80]. The exercise contribution to the oxidative balance in the heart is noteworthy, wherein the control of the redox environment counteracted the nutritional insult's detrimental effects.

Since the transcription of genes related to acetylation were sensitive to both nutrition and exercise, it would be expected that undernourished trained animals had the highest mRNA expression; however, it seems that exercise acted as a modulator of SIRT's profile, avoiding the gene overexpression. Interestingly, only normal-diet-fed animals converted the mRNA signals in protein content. As protein synthesis is a multistep process that requires large amounts of ATP, and, the undernourished animals have decreased their capacity to produce it, our data suggest that the gene and protein expression disparities are, in part, due to the energy reduction in the LS group. Furthermore, it had been demonstrated that a low-protein diet affects mTOR signaling and ribosomal content in the offspring, deregulating the machinery involved in the protein synthesis [81,82].

Gorsky (2019), in a heart failure model, demonstrated that low levels of the SIRT1 correlate with higher sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase acetylation, in turn,

down-regulating the calcium management by cardiomyocytes, which reinforces our idea of calcium overload in the undernourished animals [83]. Additionally, SIRT3 is involved in the myocardial energy preference by modulating the glucose and lipid metabolism as well as the activity of the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation [84], wherein cells without SIRT3 substantially decrease their ATP synthesis [85]. It has been demonstrated that a decrease in the content of sirtuins switches the energetic substrate toward the glycolytic metabolism, increasing the cardiac work and predisposing the myocardial hypertrophy [86,87]. Fukushima et al. (2018), evaluating congenital heart disease newborns, highlight the metabolic difference between hypertrophied and nonhypertrophied hearts, wherein the hypertrophy delays the development of the fatty acid metabolism [88]. Pilai et al. (2015), by using a pharmacological strategy to up-regulate SIRT expression, demonstrate that the increase in SIRT3 decreases the accumulation of interstitial fibrosis and the ventricular wall thickness, attenuating the cardiac hypertrophy [89].

Our protocol has not changed the lysine acetylation in normal-diet-fed animals, but in low-protein animals, the findings demonstrate that the exercise in early life restores the overall mitochondrial and oxidative parameters by up-regulating SIRT 1 and 3 expression-related cardiac acetylation. As different outcomes, throughout our organism, follow the type of exercise and the period of its application, this study adds essential information to the developmental origins of health and disease field, demonstrating that the moderate physical training in childhood has a therapeutic effect of preventing the impairments of the maternal protein undernutrition. It seems that the maternal low-protein diet impairs the newborn cardiac development by sustaining the glycolytic energetic preference, which, in turn, might overload the heart.

Despite the exciting findings, some points need to be addressed, such as, I) time intervention of the exercise; II) minimal exercise sessions to generate such metabolic improvements; III) long-lasting effect of the cardiac improvements; and IV) whether diseased heart would respond similarly to the exercise protocol, requiring more studies on the field.

Conclusion

Maternal low-protein diet in offspring results in detrimental changes in the cardiac mitochondria. Conversely, moderate physical training during the juvenile stage of development restores cardiac oxidative balance by sirtuins modulation. Based on our results, we speculate that early intervention with moderate physical training in children who had suffered poor nutrition in utero or during early childhood can delay or prevent heart-related chronic diseases.

CRedit authorship contribution statement

A.A.S.P. performed conceptualization, methodology, investigation, data curation, visualization, writing – original

draft, and project administration. **E.M.B., A. R. P., S.C.A. S., T. A.L., C. M.F. and J.C.S. J.** performed methodology, investigation, data curation, visualization, formal analysis, and writing – original draft. **D.A.G.** performed methodology, resources, supervision, and project administration. **D.S.F.** performed conceptualization, methodology, investigation, writing – review and editing, supervision, and project administration. **C.J.L.** performed conceptualization, methodology, investigation, resources, funding acquisition, writing – review and editing, supervision, and project administration.

Funding

FACEPE: APQ-0765-4.05/10; APQ-1026-4.09/12; and CNPq: Universal-408403/2016.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

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

References

- [1] Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004; 430:419–21.
- [2] Gluckman PD, Hanson MA, Mitchell MD. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome Med* 2010;2:14.
- [3] Barker DJ. Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 1999;80:305–7.
- [4] Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106:272–80.
- [5] Blackmore HL, Ozanne SE. Programming of cardiovascular disease across the life-course. *J Mol Cell Cardiol* 2015;83:122–30.
- [6] Tappia PS, Gabriel CA. Role of nutrition in the development of the fetal cardiovascular system. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4: 211–25.
- [7] Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2: 577–80.
- [8] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171–4.
- [9] Tappia PS, Guzman C, Dunn L, Aroutiounova N. Adverse cardiac remodeling due to maternal low protein diet is associated with alterations in expression of genes regulating glucose metabolism. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2013;23:130–5.
- [10] Hanson M, Gluckman P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease: the role of predictive adaptive responses. *Heart* 2005;91:864–6.
- [11] Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2014.

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.numecd.2021.01.006>

- [12] de Brito Alves JL, de Oliveira JM, Ferreira DJ, de Barros MA, Nogueira VO, Alves DS, et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016.
- [13] Ferreira DJ, da Silva Pedroza AA, Braz GR, da Silva-Filho RC, Lima TA, Fernandes MP, et al. Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res* 2016.
- [14] Ferreira DJ, Liu Y, Fernandes MP, Lagranha CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci* 2015.
- [15] Ferreira DJS, Pedroza AA, Braz GRF, Fernandes MP, Lagranha CJ. Mitochondrial dysfunction: maternal protein restriction as a trigger of reactive species overproduction and brainstem energy failure in male offspring brainstem. *Nutr Neurosci* 2018;1–11.
- [16] Nascimento L, Freitas CM, Silva-Filho R, Leite AC, Silva AB, da Silva AI, et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metabol* 2014;39:880–7.
- [17] Pedroza A, Ferreira DS, Santana DF, da Silva PT, de Aguiar Junior FCA, Sellitti DF, 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. *Appl Physiol Nutr Metabol* 2019;44:164–71.
- [18] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335–44.
- [19] Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 2010;45:466–72.
- [20] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13.
- [21] Sabbahi A, Arena R, Elokda A, Phillips SA. Exercise and hypertension: uncovering the mechanisms of vascular control. *Prog Cardiovasc Dis* 2016;59:226–34.
- [22] Lavie CJ, Arena R, Swift DL, Johannsen NM, Sui X, Lee DC, et al. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. *Circ Res* 2015;117:207–19.
- [23] MacKay-Lyons M, Billinger SA, Eng JJ, Dromerick A, Giacomantonio N, Hafer-Macko C, et al. Aerobic exercise recommendations to optimize best practices in Care after stroke: AER-OBICS 2019 update. *Phys Ther* 2020;100:149–56.
- [24] Nasi M, Patrizi G, Pizzi C, Landolfo M, Boriani G, Dei Cas A, et al. The role of physical activity in individuals with cardiovascular risk factors: an opinion paper from Italian Society of Cardiology-Emilia Romagna-Marche and SIC-Sport. *J Cardiovasc Med* 2019;20:631–9.
- [25] Hoppeler H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *J Exp Biol* 2016;219:205–13.
- [26] Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sports Med* 2013;43:927–54.
- [27] Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports Med* 2013;43:313–38.
- [28] Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;44:142–52.
- [29] Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 2008;44:153–9.
- [30] Mi C, Qin X, Hou Z, Gao F. Moderate-intensity exercise allows enhanced protection against oxidative stress-induced cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2019;52:e8009.
- [31] Santos-Alves E, Rizo-Roca D, Marques-Aleixo I, Coxito P, Martins S, Guimaraes JT, et al. Physical exercise positively modulates DOX-induced hepatic oxidative stress, mitochondrial dysfunction and quality control signaling. *Mitochondrion* 2019;47:103–13.
- [32] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074–80.
- [33] Costelloe T, Fitzgerald J, Murphy NJ, Flaus A, Lowndes NF. Chromatin modulation and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 2006;312:2677–86.
- [34] Kou CY, Lau SL, Au KW, Leung PY, Chim SS, Fung KP, et al. Epigenetic regulation of neonatal cardiomyocytes differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:278–83.
- [35] Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J. Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ Res* 2010;107:1470–82.
- [36] Lee JH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3374–9.
- [37] Zhang HN, Dai Y, Zhang CH, Omondi AM, Ghosh A, Khanra I, et al. Sirtuins family as a target in endothelial cell dysfunction: implications for vascular ageing. *Biogerontology* 2020.
- [38] Amorim MF, dos Santos JA, Hirabara SM, Nascimento E, de Souza SL, de Castro RM, et al. Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? *Exp Physiol* 2009;94:906–13.
- [39] Moita L, Lustosa MF, Silva AT, Pires-de-Melo IH, de Melo RJ, de Castro RM, et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. *Neuroimmunomodulation* 2011;18:103–10.
- [40] Falcão-Tebas F, Bento-Santos A, Fidalgo MA, de Almeida MB, dos Santos JA, Lopes de Souza S, et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr* 2012;107:372–7.
- [41] Leandro CG, da Silva Ribeiro W, Dos Santos JA, Bento-Santos A, Lima-Coelho CH, Falcão-Tebas F, et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *Eur J Nutr* 2012;51:807–15.
- [42] Braz GR, Ferreira DS, Pedroza AA, da Silva AI, Sousa SM, Pithon-Curi TC, et al. Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats. *Appl Physiol Nutr Metabol* 2015;40:959–62.
- [43] da Silva Pedroza AA, Lopes A, Mendes da Silva RF, Braz GR, Nascimento LP, Ferreira DS, et al. Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? *Life Sci* 2015;137:133–41.
- [44] Ferreira DS, Liu Y, Fernandes MP, Lagranha CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci* 2016;19:369–75.
- [45] Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res* 2010;106:1681–91.
- [46] Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011;435:297–312.
- [47] Blattner JR, He L, Lemasters JJ. Screening assays for the mitochondrial permeability transition using a fluorescence multiwell plate reader. *Anal Biochem* 2001;295:220–6.
- [48] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [49] Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993;15:353–63.
- [50] Cardoso HD, Passos PP, Lagranha CJ, Ferraz AC, Santos Junior EF, Oliveira RS, et al. Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front Hum Neurosci* 2012;6:249.
- [51] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357–63.
- [52] Braz GR, Freitas CM, Nascimento L, Pedroza AA, da Silva AI, Lagranha C. Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart. *Appl Physiol Nutr Metabol* 2016;41:362–9.
- [53] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- [54] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [55] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.

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.numecd.2021.01.006>

- [56] da Silva AI, Braz GR, Silva-Filho R, Pedroza AA, Ferreira DS, Manhaes de Castro R, et al. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl Physiol Nutr Metabol* 2015;40:565–74.
- [57] Wiegand G, Remington SJ. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Chem* 1986;15:97–117.
- [58] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26.
- [59] Braz GRF, Emiliano AS, Sousa SM, Pedroza AAS, Santana DF, Fernandes MP, et al. Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol. *J Dev Orig Health Dis* 2017;8:322–30.
- [60] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [61] Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants Redox Signal* 2008;10:179–206.
- [62] Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford UK: United Kingdom; 2007.
- [63] Rodriguez-Rodriguez P, Lopez de Pablo AL, Garcia-Prieto CF, Somoza B, Quintana-Villamandos B, Gomez de Diego JJ, et al. Long term effects of fetal undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress. *PloS One* 2017;12:e0171544.
- [64] Fattal-Valevski A, Bernheim J, Leitner Y, Redianu B, Bassan H, Harel S. Blood pressure values in children with intrauterine growth retardation. *Isr Med Assoc J : IMAJ*. 2001;3:805–8.
- [65] Gluckman PD, Lillycrop KA, Vickers MH, Pleasants AB, Phillips ES, Beedle AS, et al. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12796–800.
- [66] Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the helsinki birth cohort. *Ann Hum Biol* 2009;36:445–58.
- [67] Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:90–3.
- [68] Chatfield KC, Sparagna GC, Chau S, Phillips EK, Ambardekar AV, Aftab M, et al. Elamipretide improves mitochondrial function in the failing human heart. *JACC Basic to translational science* 2019;4:147–57.
- [69] Ayoub KF, Pothineni NVK, Rutland J, Ding Z, Mehta JL. Immunity, inflammation, and oxidative stress in heart failure: emerging molecular targets. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017;31:593–608.
- [70] Beutner G, Alavian KN, Jonas EA, Porter Jr GA. The mitochondrial permeability transition pore and ATP synthase. *Handb Exp Pharmacol* 2017;240:21–46.
- [71] Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants Redox Signal* 2013;18:2029–74.
- [72] Ferreira DJ, Sellitti DF, Lagranha CJ. Protein undernutrition during development and oxidative impairment in the central nervous system (CNS): potential factors in the occurrence of metabolic syndrome and CNS disease. *J Develop Origins of Health and Dis* 2016;1–12.
- [73] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C817–33.
- [74] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014;24:R453–62.
- [75] Ji LL, Dickman JR, Kang C, Koenig R. Exercise-induced hormesis may help healthy aging. *Dose Response* 2010;8:73–9.
- [76] Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:425–35.
- [77] Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003;25:295–311.
- [78] Chuang CY, Degendorfer G, Davies MJ. Oxidation and modification of extracellular matrix and its role in disease. *Free Radic Res* 2014;48:970–89.
- [79] Yancey DM, Guichard JL, Ahmed MI, Zhou L, Murphy MP, Johnson MS, et al. Cardiomyocyte mitochondrial oxidative stress and cytoskeletal breakdown in the heart with a primary volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;308:H651–63.
- [80] Cuevas-Duran RE, Medrano-Rodriguez JC, Sanchez-Aguilar M, Soria-Castro E, Rubio-Ruiz ME, Del Valle-Mondragon L, et al. Extracts of *Crataegus oxyacantha* and *Rosmarinus officinalis* attenuate ischemic myocardial damage by decreasing oxidative stress and regulating the production of cardiac vasoactive agents. *Int J Mol Sci* 2017;18.
- [81] King R, Hill JL, Saha B, Tong Y, Strutt BJ, Russell MA, et al. Offspring of mice exposed to a low-protein diet in utero demonstrate changes in mTOR signaling in pancreatic islets of langerhans, associated with altered glucagon and insulin expression and a lower beta-cell mass. *Nutrients* 2019;11.
- [82] Fiorotto ML, Davis TA, Sosa HA, Villegas-Montoya C, Estrada I, Fleischmann R. Ribosome abundance regulates the recovery of skeletal muscle protein mass upon recuperation from postnatal undernutrition in mice. *J Physiol* 2014;592:5269–86.
- [83] Gorski PA, Jang SP, Jeong D, Lee A, Lee P, Oh JG, et al. Role of SIRT1 in modulating acetylation of the sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in heart failure. *Circ Res* 2019;124:e63–80.
- [84] Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14447–52.
- [85] Vassilopoulos A, Pennington JD, Andresson T, Rees DM, Bosley AD, Fearnley IM, et al. SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. *Antioxidants Redox Signal* 2014;21:551–64.
- [86] Huang Y, Zhang K, Jiang M, Ni J, Chen J, Li L, et al. Regulation of energy metabolism by combination therapy attenuates cardiac metabolic remodeling in heart failure. *Int J Biol Sci* 2020;16:3133–48.
- [87] Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996;94:2837–42.
- [88] Fukushima A, Zhang L, Huqi A, Lam VH, Rawat S, Altamimi T, et al. Acetylation contributes to hypertrophy-caused maturational delay of cardiac energy metabolism. *JCI Insight* 2018;3.
- [89] Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, Raghuraman H, Kim G, Bonner MY, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3. *Nat Commun* 2015;6:6656.