

ADRIANO BENTO SANTOS

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PERINATAL
SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO ISOLADO DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO
ADRENÉRGICA**

RECIFE

2012

ADRIANO BENTO SANTOS

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PERINATAL
SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO ISOLADO DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO
ADRENÉRGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro, professor adjunto do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Co-orientadora: Profa. Dra. Carol Virgínia Góis Leandro, professora adjunta do Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco.

RECIFE

2012

Santos, Adriano Bento

Efeitos da desnutrição protéica perinatal sobre o metabolismo energético do músculo esquelético isolado de ratos adultos submetidos à estimulação adrenérgica / Adriano Bento Santos. – Recife: O Autor, 2012.

77 folhas: il., fig., gráf., quadro. ; 30 cm

Orientador: Raul Manhães de Castro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2012.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Metabolismo. 2. Programação fetal. 3. Glicose. 4. Ácidos graxos. 5. Músculo esquelético.
I. Castro, Raul Manhães de. II. Título.

616.8

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2012-030

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria
e Ciências do Comportamento

122ª DEFESA

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DO MESTRANDO ADRIANO BENTO SANTOS**

No dia 14 de fevereiro de 2012, às 9h, no Auditório do 2º andar do Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco os Professores: René Duarte Martins, Doutor Professor do Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Cláudia Jacques Lagranha, Doutora Professora do Núcleo de Educação Física do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE e João Henrique da Costa Silva, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram o Mestrando ADRIANO BENTO SANTOS, sobre a sua Dissertação intitulada **“EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PERINATAL SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO ISOLADO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA”**, orientado pelo professor Raul Manhães de Castro. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do Mestrando as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Prof. Dr. René Duarte Martins

Profª. Drª. Cláudia Jacques Lagranha

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

APROVADO
APROVADO
APROVADO

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que mesmo não tendo a oportunidade de estudar, sempre souberam que uma forma digna de mudança da nossa triste realidade social é através da educação e da humanização do ser. Por isso, sempre fizeram questão, e lutaram bravamente, para que nossas vidas (minha e de meu irmão) fossem mudadas por intermédio dos estudos.

Agradecimentos especiais 1

À minha família: minha mãe Maria Luzinete e meu pai José Manoel (meus exemplos de que é possível lutar pela sobrevivência sem deixar de ser humano), meu irmão Robson Bento (meu exemplo de empenho e dedicação aos estudos), meu tio Floresta (o cara que sempre esteve conosco seja nos momentos de festa e, principalmente, nos momentos mais difíceis – sem ele nada disso seria possível), meu brother Carlos Alberto, meu tio João e minha prima Deda (que sempre me apoiaram neste desafio).

Agradecimento todo especial à Adriana Aneilza, porque como já dizia o filósofo... “por trás de um grande homem, há sempre uma grande mulher...”, no meu caso, a mulher responsável pelo meu reencontrar na vida e principalmente por me ajudar incondicionalmente, além de suportar tantos estresses e ausências de minha parte... “minha linda, lembra daquelas noites que disse que viraria no laboratório?... elas foram essenciais para que tudo isso pudesse acontecer... muito obrigado por entender e nunca duvidar...”.

Agradecimentos especiais 2

Carol,

Minha querida, refletindo sobre o que aconteceu comigo desde que te conheci, mais significativamente nestes últimos dois anos, chego à conclusão que: “eu já não sou eu, pelo menos, não sou o mesmo em meu interior e na forma de pensar...”

Muito obrigado pelo acolhimento, ensinamentos, confiança, carinho, respeito e principalmente sua amizade. Você é muito especial para mim... você me conquistou... você não faz idéia do quanto sou e serei eternamente grato e fiel a você!

Muito obrigado por tudo!

Prof. Raul,

Caro companheiro, obrigado pela seriedade, amor e respeito com que trata a ciência e tem tratado a mim... com sua forma (única) de falar o que pensa e estimular nós (“seus filhos”) a refletir e evoluir, tanto no ponto de vista científico quanto humano. Obrigado!

Jéssica,

Minha querida, você é uma pessoa muito especial para mim, não tenho nenhuma dúvida que com este seu caráter, instituído em humildade, honestidade, seriedade, equilíbrio e muita força de vontade, você terá um futuro brilhante... gostaria de lhe dizer que tenho em você uma amiga e que, sem você, esta trajetória seria muito mais árdua.

Muito obrigado por tudo... e conte comigo para qualquer coisa!

Agradecimentos

A Marco Fidalgo, como já havia falado anteriormente (na realização de um outro sonho)... “você é meu exemplo de luta, superação e conquista”... obrigado por ter agido diferente em meio a toda aquela estagnação... obrigado por me convidar e me mostrar uma nova possibilidade... graças a você estou realizando mais um sonho. Muito obrigado por tudo!

A Claudia, por toda paciência, dedicação e conhecimento compartilhados comigo.

A Candido, pela disponibilidade em ajudar, ensinamentos e conselhos.

A João Henrique, pelas dicas e orientações essenciais que nos possibilitou realizar os experimentos com músculo isolado.

Ao Professor Almir Wanderley pelo espaço e equipamento cedido.

Ao Professor Renê Duarte pelo espaço e equipamentos cedidos.

A Filippe (PPE), Antônio (toin) e Diogo (coxinha) pelas discussões, companheirismo, sinceridade e amizade.

A todos os integrantes da “família” NNJ – DOHAD.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da UFPE.

A Dr. França pelas orientações no dia-dia.

Aos meus atemporais amigos: Leandro, Fernanda, Alessandra, “Dr.” Thiago, Flavia, Wilson, Marcio, Keila, Ana, Denis, Keka, Gleice, Hubert, Ana, Luciana, Alessandra (fofa), Patricia, Cristiano e Renata.

Aos companheiros e amigos conquistados nestes últimos dois anos: Diorginis, Renata, Cinthia, Rafaela, Raphael (Ogro), Sueli, Amandas (Sales e Sourgey), Louana, Tatiana, Lúvia, Élder, Sidraiton, Lúcia, Ludimila, Paula, Thyciara, Soledade e Jaqueline.

Muito obrigado!!!

“Quanto mais você se educa, mais você compreende as origens de tudo, mais óbvios se tornam os fatos e mentiras que surgem por todos os lados. Você tem que saber a verdade, procurar a verdade, e ela o libertará”.

Jordan Maxwell

RESUMO

O objetivo desta dissertação foi avaliar em ratos adultos, os efeitos da desnutrição protéica perinatal no metabolismo energético do músculo esquelético isolado submetido à estimulação adrenérgica. Ratas Wistar foram divididas em dois grupos de acordo com a manipulação nutricional durante toda gestação e lactação: o grupo controle recebeu uma dieta com 17% caseína (C, n=6) e o grupo desnutrido recebeu uma dieta com 8% de caseína (LP, n=6). O peso corporal e o consumo alimentar foram avaliados semanalmente. No primeiro dia após o nascimento foi verificado o tamanho e o peso das ninhadas. Após o desmame os filhotes receberam dieta padrão de biotério e foram avaliados quanto ao peso corporal, comprimento corporal e o ganho de peso corporal até a idade adulta. Aos 100 dias de idade os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e foram sacrificados para retirada dos tecidos. Foi retirado o sangue do animal para avaliar, através de espectrofotometria e ELISA, as concentrações séricas de proteínas totais, glicose, colesterol, triglicerídeos, leptina e insulina. Ambos, os músculos sóleo e EDL foram removidos e incubados em equipamento de banho isolado de tecidos por duas horas com fenilefrina 10^{-5} M, um agonista seletivo do receptor α_1 -adrenérgico, ou com isoprenalina 10^{-5} M, um agonista dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgico. Após a estimulação adrenérgica dos músculos, foram avaliadas a atividade das enzimas citrato sintase, PFK e β -HAD. Nossos resultados demonstram que animais submetidos à desnutrição protéica perinatal apresentam menor peso no nascimento e maior ganho de peso pós-natal. Com relação às avaliações do soro observamos apenas uma redução na concentração de proteínas totais em animais desnutridos. No músculo sóleo, foi observado que animais desnutridos apresentaram menor atividade da enzima β -HAD e que mesmo quando estimulados com α ou β agonistas a atividade desta enzima permaneceu reduzida. No músculo EDL, a atividade das enzimas PFK e CS foi maior em animais desnutridos em relação ao controle. Quando tratados com isoprenalina animais desnutridos apresentaram redução da atividade da enzima PFK e um aumento da atividade da enzima β -HAD em relação aos animais desnutridos que foram tratados com fenilefrina e os que não foram tratados. O presente estudo mostrou que a desnutrição protéica perinatal programa o metabolismo energético de forma diferente em dois tipos de músculos esqueléticos. No músculo predominantemente oxidativo, diminui a atividade da enzima chave da beta oxidação de ácidos graxos, sendo este efeito persistente mesmo quando estimulados com agonistas adrenérgicos. Enquanto que, no músculo predominantemente glicolítico, aumenta a atividade de enzimas chaves do metabolismo dos carboidratos e quando estimulados com β -agonista adrenérgico induz o metabolismo dos ácidos graxos e inibe o metabolismo glicolítico.

Palavras chaves: Metabolismo, Programação Fetal, Glicose, Ácidos Graxos, Músculo Esquelético, Plasticidade do Desenvolvimento

ABSTRACT

The aim of this thesis was evaluate in adult rats, the effects of perinatal malnutrition in the energy metabolism of isolated skeletal muscle subjected to adrenergic stimulation. Wistar rats were divided in two groups according to nutritional manipulation throughout pregnancy and lactation: the control group received a diet with 17% casein (C, n = 6) and the malnourished group received a diet with 8% casein (LP, n = 6). Body weight and food consumption were evaluated weekly. In the first day after birth was recorded the size and weight of litters. After weaning the pups received standard laboratory chow and were assessed body weight, body length and body weight gain through adulthood. At 100 days of age the animals were fasted for 12 hours and were sacrificed for removal of tissues. Trunk blood was collected for the analysis by spectrophotometric and ELISA, serum concentrations of total protein, glucose, cholesterol, triglycerides, leptin and insulin. Both EDL and soleus muscles were removed and incubated in bathing equipment isolated from tissues for two hours with phenylephrine 10^{-5} M, a selective α_1 -adrenergic receptor agonist, or isoprenaline 10^{-5} M, a β_1 - and β_2 -adrenoreceptor agonist. After adrenergic stimulation of the muscles, we assessed the activity of the enzymes citrate synthase, β -HAD and PFK. Our results demonstrate that animals subjected to perinatal malnutrition have lower birth weight and greater weight gain post-natal. With regard to assessments of serum we observed a reduction in the concentration of total proteins in malnourished animals. In soleus muscle, we observed that malnourished animals showed lower activity of the enzyme β -HAD and that same when stimulated with α or β agonist activity of this enzyme has remained low. In EDL muscle, the activity of enzymes PFK and CS was higher in malnourished animals compared to control. When treated with isoprenaline malnourished animals showed reduced activity of the enzyme PFK and an increased activity of the enzyme β -HAD compared to malnourished animals treated with phenylephrine, and those not treated. The present study showed that perinatal protein malnutrition program energy metabolism differently in two types of skeletal muscles. In the predominantly oxidative muscle, decreases the activity of key enzyme of beta oxidation of fatty acids, and this effect persisted same when stimulated with agonists. While in the predominantly glycolytic muscle, increases the activity of key enzymes of carbohydrate metabolism and when stimulated with β -adrenergic agonist induces the metabolism of fatty acids and inhibits the glycolytic metabolism.

Key words: Metabolism, Fetal Programming, Glucose, Fatty acid, Skeletal Muscle, Developmental Plasticity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

QUADRO1	Composição centesimal da dieta à base de caseína	40
---------	--	----

FIGURAS

- FIGURA 1** Equipamento de banho de órgãos isolados. 42
- FIGURA 2** Formação dos grupos experimentais de acordo com a manipulação 43
nutricional das ratas e exposição dos músculos da prole aos α e β
agonistas adrenérgicos.
- ARTIGO 1** **FIGURA 1** Modulação do metabolismo energético muscular por 35
meio de sinais adrenérgicos. As setas em azul
representam os efeitos intracelulares gerados pela
propagação do sinal adrenérgico no músculo,
enquanto que, as setas em rosa demonstram os efeitos
induzidos pelo aumento da concentração de citrato,
em decorrência do estado energético positivo. NE,
noradrenalina; ADR, adrenalina; R, receptor
adrenérgico; G-s, proteína G estimulatória; AC,
adenilato ciclase; ATP, trifosfato de adenosina; AMP-
c, AMP cíclico; AMP, adenosina 3' 5' monofosfato;
AMPK, proteína kinase dependente de AMP; ACC,
acetil CoA carboxilase; PKA, proteína kinase A; LSH,
lípase sensível a hormônio; TG, triglicerídeos; AG,
ácidos graxos; LCFA-CoA, ácidos graxos de cadeia
longa ativados; CAT, complexo carnitina acil-
transferase; CK, ciclo de Krebs; CTE, cadeia
transportadora de elétrons; UCP-3, proteína
desacopladora; GLUT-4, transportador de glicose.
- FIGURA 2** Desnutrição nos períodos de alta plasticidade do 36
organismo pode induzir alterações no hipotálamo e no
músculo esquelético e, na idade adulta, repercutir no
controle hipotalâmico do metabolismo muscular, via
sistema adrenérgico. Dentre os locais cuja desnutrição
perinatal parece induzir alterações estão: 1 – sensores
de nutrientes hipotalâmicos; 2 – ligação e sinalização
das catecolaminas nos receptores adrenérgicos
musculares.

ARTIGO 2 FIGURA 1 Body Weight (A), Body Length (B), BMI (C) and the 69
Gain of Body Weight (D) in the offspring. Control
(Cp, $n=18$) and low-protein diet (LPp, $n=18$).
Measurements were taken every ten days from
weaning to 90 days old. Data are presented as means
 $\pm$ S.E.M. * $P<0.05$ versus Cp. using Student's t test.

FIGURA 2 Effects of maternal protein restriction on activities of 70
enzymes citrate synthase (A), PFK (B), β -HAD (C) in
the isolated soleus muscle subjected to adrenergic
stimulation. Control pups (Cp, $n=6$); control pups
submitted to phenylephrine 10^{-5} M (Cp+ α , $n=6$);
control pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (Cp+ β ,
 $n=6$); low-protein diet pups (LPp, $n=6$); low-protein
diet pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (LPp+ α ,
 $n=6$) and low-protein diet pups submitted to
isoprenaline 10^{-5} M (LPp+ β , $n=6$). Data are presented
as means + S.E.M. * $P<0.05$ versus yours respective
control (Cp, Cp + α , or Cp + β) using Student's t test.

FIGURA 3 Effects of maternal protein restriction on activities of 71
enzymes citrate synthase (A), PFK (B), β -HAD (C) in
the isolated EDL muscle subjected to adrenergic
stimulation. Control pups (Cp, $n=6$); control pups
submitted to phenylephrine 10^{-5} M (Cp+ α , $n=6$);
control pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (Cp+ β ,
 $n=6$); low-protein diet pups (LPp, $n=6$); low-protein
diet pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (LPp+ α ,
 $n=6$) and low-protein diet pups submitted to
isoprenaline 10^{-5} M (LPp+ β , $n=6$). Data are presented
as means + S.E.M. * $P<0.05$ versus yours respective
control (Cp, Cp + α , or Cp + β) using Student's t test.
§ $P<0.05$ versus Cp. # $P<0.05$ versus LPp. & $P<0.05$
versus LPp + α , by using one-way ANOVA and
Tukey's post hoc test.

LISTA DE TABELAS**TABELAS**

ARTIGO 2	TABELA 1	Gain of body weight and food intake during 67 gestation and lactation of mother's that were submitted to either a control (C) or a low-protein diet (LP) during perinatal period.
	TABELA 2	Effects of maternal protein restriction on organ 68 weights of offspring at 100 days of age.
	TABELA 3	Effects of maternal protein restriction on 69 biochemical and hormonal serum parameters of offspring at 100 days of age.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil CoA Carboxilase
AgRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AMPK	AMP kinase
ARQ	Núcleo Arqueado
ATP	Adenosina Trifosfato
BMI	Índice de Massa Corporal
CA	Comportamento Alimentar
CART	Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
CAT1	Carnitina Acil Transferase 1
CS	Citrato Sintase
DAG	Diacilglicerol
EDL	Extensor Longo dos Dedos
GLUT-4	Transportador de Glicose 4
IRS-1	Substrato Receptor de Insulina 1
LCFA-CoA	Ácidos Graxos de Cadeia Longa Ativados
LSH	Lipase Sensível a Hormônios
NPV	Núcleo Paraventricular
NPY	Neuropeptídeo Y
NVM	Núcleo Ventro-medial
PFK	Fosfofrutoquinase
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C
POMC	Pró-opiomelanocortina
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TGIM	Triglicerídeo Intramuscular
UCP-3	Proteína Desacopladora Mitocondrial
α -MSH	Hormônio Estimulador de Melanócitos alfa
β -HAD	Beta Hidroxi Acildesidrogenase

GRUPOS EXPERIMENTAIS

C	Controle
LP	Desnutrido
Cp	Filhotes de mães controle
LPp	Filhotes de mães desnutridas
Cp	Músculo de filhotes de mães controle que não foram tratados com nenhum agonista
Cp + α	Músculo de filhotes de mães controle que foram tratados com fenilefrina
Cp + β	Músculo de filhotes de mães controle que foram tratados com isoprenalina
LPp	Músculo de filhotes de mães desnutridas que não foram tratados com nenhum agonista
Lp + α	Músculo de filhotes de mães desnutridas que foram tratados com fenilefrina
Lp + β	Músculo de filhotes de mães desnutridas que foram tratados com isoprenalina

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição perinatal: efeitos sobre o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético	20
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. HIPÓTESES	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Animais	39
5.2 Escolha das ratas para o acasalamento	39
5.3 Manipulação da dieta das ratas e formação dos grupos experimentais	39
5.4 Avaliação do peso corporal e consumo alimentar das mães	40
5.5 Avaliação dos parâmetros biométricos da prole	40
5.6 Avaliações bioquímicas e hormonais do soro de ratos adultos	41
5.7 Procedimentos experimentais para estimulação adrenérgica no músculo esquelético isolado	41
5.8 Drogas e Reagentes	44
5.9 Ensaio enzimático no músculo esquelético	44
5.10 Análises Estatística	44
6. RESULTADOS	46
Perinatal low protein diet-induced predictive changes on the metabolism of isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation	46
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	75

1. APRESENTAÇÃO

Diversas são as doenças prevalentes na atualidade, entre elas, cardiopatias, diabetes, hipertensão arterial e obesidade. Estudos têm demonstrado que o estilo de vida dos indivíduos na sociedade atual apresenta uma relação com a prevalência destas doenças, contudo, recentemente, tem sido proposto que alterações no ambiente perinatal também podem ter uma influência sobre o desenvolvimento dessas doenças. Uma das explicações propostas para entender a relação entre agressões sofridas nos períodos críticos e as repercussões tardias sobre os sistemas fisiológicos é proposta pela plasticidade fenotípica, que corresponde à capacidade do indivíduo modificar o fenótipo de acordo com alterações ambientais. Por exemplo, em resposta a uma restrição de nutrientes no início da vida, o organismo promove adaptações metabólicas para sobreviver nesse ambiente. Porém, se a disponibilidade de nutrientes é aumentada gera um conflito entre a programação metabólica e o novo estado nutricional, podendo levar ao surgimento de doenças na vida adulta. Recentemente, tem sido proposto que a programação de algumas doenças metabólicas, como a obesidade, podem ter mecanismos independentes dos efeitos da desnutrição perinatal sobre o comportamento alimentar. Assim, as repercussões de uma desnutrição protéica perinatal podem estar relacionadas às alterações no metabolismo energético sem necessariamente apresentar mudanças no comportamento alimentar.

Sendo assim, a pergunta condutora que norteou esta pesquisa é “quais os efeitos da desnutrição protéica perinatal sobre o metabolismo energético do músculo esquelético estimulados com agonistas adrenérgicos?”. O presente estudo teve como objetivo avaliar em ratos adultos, os efeitos da desnutrição protéica perinatal no metabolismo energético do músculo esquelético isolado submetido à estimulação adrenérgica. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Dra.

Naíde Teodósio do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, tendo como orientadores o Prof. Dr. Raul Manhães de Castro e a Profa. Dra. Carol Virgínia Góis Leandro. Parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco e com o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

O estudo gerou 02 artigos científicos, um já foi submetido e o outro será enviado após suas correções. O primeiro, intitulado: “Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição perinatal: efeitos sobre o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético”, foi submetido como artigo de revisão na Revista de Nutrição da PUCCAMP. Esta revista é classificada com qualis B4 no comitê de Medicina II da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Neste estudo, que será utilizado como revisão da literatura para a dissertação, foi apresentada uma revisão sobre a plasticidade fenotípica e o papel da desnutrição perinatal como possível indutora da programação do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético. O mecanismo sugerido pelo qual a desnutrição no início da vida favorece o desenvolvimento de obesidade e comorbidades associadas, na vida adulta, é através de alterações no controle hipotalâmico do metabolismo energético muscular por meio de interferências na conexão hipotálamo-músculo.

O segundo artigo será apresentado como resultado da pesquisa e estará disposto em sua versão original. Este artigo tem como título: “Perinatal low protein diet-induced predictive changes on the metabolism of isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation”, será submetido como artigo original em uma revista com qualis A1 no comitê de Medicina II da CAPES. Em resumo, neste artigo, demonstramos que a

desnutrição protéica perinatal programa o metabolismo energético de forma diferente em dois tipos de músculos esqueléticos. No músculo predominantemente oxidativo, diminui a atividade da enzima chave da beta oxidação de ácidos graxos, sendo este efeito persistente mesmo quando estimulados com agonistas adrenérgicos. Enquanto que, no músculo predominantemente glicolítico, aumenta a atividade de enzimas chaves do metabolismo dos carboidratos e quando estimulados com agonista adrenérgico induz o metabolismo dos ácidos graxos e inibe o metabolismo glicolítico.

2. REVISÃO DA LITERATURA – ARTIGO DE REVISÃO

ARTIGO DE REVISÃO – SUBMETIDO AO CONSELHO EDITORIAL DA REVISTA DE NUTRIÇÃO

Título: Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição perinatal: efeitos sobre o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético

Title: Phenotype plasticity induced by perinatal malnutrition: effects on the hypothalamic control of feeding behavior and of the energetic metabolism in skeletal muscle

Título resumido: Desnutrição e metabolismo energético

Short Title: Malnutrition and energetic metabolism

Autores: Adriano Bento-Santos¹; Leonardo dos Reis Silveira²; Raul Manhães-de-Castro³; Carol Virginia Gois Leandro⁴

¹Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco - Brasil

²Departamento de Educação Física e Esporte – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil

³Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco - Brasil

⁴Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco – Brasil

Contribuição dos autores:

¹Consulta as bases de dados e escrita do artigo;

⁴Escrita e revisão do artigo;

^{2,3}Revisão final do artigo.

Endereço para correspondência:

Adriano Bento Santos

Pós-graduação Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária – Recife – PE - CEP: 50670-901

Fone: (81) 21268539

E-mail: absbio@yahoo.com.br

Resumo

A deficiência de nutrientes durante os períodos críticos do desenvolvimento tem sido associada com maior risco para desenvolver obesidade e diabetes mellitus na vida adulta. Uma das fundamentações propostas refere-se às alterações dos mecanismos que regulam o comportamento alimentar e o metabolismo energético do músculo esquelético. O hipotálamo parece regular vias metabólicas do músculo esquelético a partir de sinais autonômicos que podem explicar as repercussões da plasticidade fenotípica. Assim, esta revisão tem como objetivo discutir os mecanismos de indução da plasticidade fenotípica pela desnutrição perinatal sobre o comportamento alimentar e suas prováveis alterações no metabolismo energético muscular e na sua modulação por sinais adrenérgicos. Foram utilizadas as bases de dados *Medline/Pubmed*, *Lilacs* e *Bireme*, com publicações entre 2000 até 2011. Os termos de indexação utilizados foram: *feeding behavior*, *energy metabolism*, *protein malnutrition*, *developmental plasticity*, *skeletal muscle* e *autonomic nervous system*. O presente estudo propõe uma análise sobre o desenvolvimento de obesidade e co-morbidades associadas com a desnutrição no início da vida e a provável contribuição da programação do comportamento alimentar e do controle hipotalâmico do metabolismo muscular através da comunicação hipotálamo-músculo via sistema adrenérgico.

Palavras chaves: Desnutrição protéica, doenças metabólicas e sistema nervoso autônomo.

Abstract

The Nutritional deficits during the critical period of development have been associated with risk to develop obesity and diabetes mellitus later in life. One of the underlying mechanisms is related to changes in feeding behavior and the metabolism of skeletal muscle. Hypothalamus may regulate metabolic pathway in skeletal muscle by using autonomic nervous system which can explain the repercussions of the phenotype plasticity. Thus, the main goal of this review is to discuss the mechanism of the phenotype plasticity by perinatal malnutrition on the feeding behavior and its changes on the metabolism of skeletal muscle by adrenergic signals. It was used the following database: *Medline/Pubmed*, *Lilacs* and *Bireme*, with publications between 2000 and 2011. The indexing terms were: *feeding behavior*, *energy metabolism*, *protein malnutrition*, *developmental plasticity*, *skeletal muscle* and *autonomic nervous system*. The present study propose an analysis on the development of obesity and co-morbidities associated with perinatal malnutrition and the probably contribution of the programming of feeding behavior and of hypothalamic control of the metabolism in skeletal muscle via adrenergic system.

Key-words: Protein malnutrition, metabolic diseases and autonomic nervous system.

Introdução

O crescimento e desenvolvimento do indivíduo são marcados por períodos de rápida proliferação e diferenciação celular (tal como gestação, lactação e primeira infância) ⁽¹⁾. Estes períodos são críticos para o desenvolvimento uma vez que órgãos e sistemas são vulneráveis as alterações ambientais ^(1, 2). Estudos com animais e humanos têm demonstrado que a desnutrição quando aplicada nos períodos críticos aumenta a predisposição do indivíduo em desenvolver doenças cardiovasculares ^(3, 4), fatores de risco associados com a hipertensão arterial, resistência à insulina ⁽⁵⁾, hiperlipidemia ⁽⁶⁾ e obesidade ⁽⁷⁾. Uma possível explicação para a relação entre agressões sofridas nos períodos críticos e as repercussões tardias sobre os sistemas fisiológicos é proposta pela plasticidade fenotípica, que corresponde à capacidade do indivíduo modificar o fenótipo de acordo com alterações ambientais ⁽⁸⁾.

O hipotálamo é o centro regulador do comportamento alimentar (C.A.) e do metabolismo energético no músculo e ambos podem apresentar mudanças fenotípicas induzidas pela desnutrição perinatal ^(9, 10). Estas alterações são de ordem química e estrutural e podem ser responsáveis por ajustes funcionais como os que ocorrem sobre a sensibilidade à insulina no músculo ^(5, 11) e sobre a expressão de moléculas que mediam o C.A. e o metabolismo energético ^(10, 12). Os circuitos neurais e as funções cerebrais presentes em regiões, como o hipotálamo, podem ser modificados permanentemente pela desnutrição no período crítico do desenvolvimento, por conseguinte pode alterar o C.A. e a homeostase energética ⁽¹⁰⁾.

Estudos experimentais demonstram que filhotes de ratas expostas à desnutrição protéica durante a gestação e lactação apresentam alteração na quantidade e proporções de fibras musculares, e resistência à insulina na idade adulta ^(5, 11, 13). Outros estudos tem demonstrado que a desnutrição perinatal induz hiperfagia na prole, promove alterações na expressão de neurotransmissores orexigênicos e anorexigênicos, na expressão de genes envolvidos com a regulação de sensores de nutrientes hipotalâmicos e no controle do metabolismo ^(14, 15). Com isso, questionamos se animais desnutridos no período perinatal além de mudanças na sensibilidade à insulina e no comportamento alimentar podem apresentar redução do metabolismo energético muscular em decorrência de alterações no controle hipotalâmico através da conexão hipotálamo-músculo? Desta forma, o objetivo deste estudo é discutir os mecanismos de indução da plasticidade fenotípica pela desnutrição perinatal sobre o comportamento alimentar e suas prováveis alterações no metabolismo energético muscular e na sua modulação por sinais adrenérgicos.

Metodologia

Para realização desta revisão, foram utilizadas as bases de dados *Medline/Pubmed*, *Lilacs* e *Bireme*. Os termos de indexação utilizados foram: *feeding behavior*, *energy metabolism*, *protein undernutrition*, *developmental plasticity*, *skeletal muscle* e *autonomic nervous system*. Os artigos foram selecionados de acordo com a relevância do estudo para os tópicos estudados. Dentre os artigos selecionados estão inclusos estudos clássicos sobre “programação fetal” a partir de 1964 e estudos atuais sobre plasticidade fenotípica. Para a discussão sobre nutrição, comportamento alimentar e metabolismo energético, foram utilizados artigos publicados entre os anos de 2000 até 2011.

O que é plasticidade fenotípica?

O termo “plasticidade fenotípica” refere à capacidade de mudança do fenótipo em resposta às alterações ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento e as repercussões na vida adulta ⁽⁸⁾. A hipótese da plasticidade fenotípica, inicialmente chamada de “programação” ⁽¹⁶⁾, propõe que o risco de desenvolver uma doença é consequência da transição de um ambiente uterino adverso para um ambiente pós-natal enriquecido ⁽¹⁷⁾.

A desnutrição perinatal é um dos fatores ambientais mais bem estudados como indutor de plasticidade fenotípica ^(6, 7). Estudos com humanos têm demonstrado que a desnutrição perinatal aumenta a predisposição do indivíduo em desenvolver doenças cardiovasculares ^(3, 4), fatores de risco associados como a hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperlipidemia ⁽⁶⁾ e obesidade ⁽⁷⁾. Em ratos, foi demonstrado que restrição alimentar (30% – 50% da ingestão do controle) ou dieta hipoprotéica (8% de caseína) no período neonatal parecem provocar déficits no desenvolvimento do cérebro e do sistema renal ⁽¹⁸⁾, além de alterações morfológicas e funcionais no coração e no músculo esquelético ^(9, 19, 20). Estudos recentes tem demonstrado que uma dieta pobre em proteína (8% de caseína) no período de gestação e lactação induz atraso na ontogênese dos reflexos e déficits no desenvolvimento de padrões motores e comportamentais de ratos ^(21, 22). Outros estudos mostram que dieta com aporte inadequado de nutrientes, no período de lactação, induz efeitos permanentes sobre o tamanho do encéfalo, número de neurônios, aprendizagem e memória ^(23, 24). De fato, regiões cerebrais que controlam determinados comportamentos podem ser irreversivelmente modificadas pela desnutrição no período crítico. Estas alterações podem ser de ordem química e/ou morfológica e ocorrer em diversas estruturas, como o hipotálamo, que tem papel chave no controle da expressão comportamental e da homeostase energética ⁽²⁵⁾.

Papel do hipotálamo no controle do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético

O hipotálamo, dentre as suas inúmeras funções, tem papel de centro regulador do CA ⁽¹⁰⁾. O C.A. refere à interação de diversos processos que envolvem a escolha do alimento, início e término da alimentação, a frequência, o tempo e o tamanho da refeição ⁽²⁶⁾. A regulação do C.A. ocorre através da complexa interação entre mecanismos periféricos e centrais que controlam a fome e a saciedade ⁽²⁷⁾. O controle central do C.A. é feito pelo hipotálamo que monitora, processa e gera respostas aos sinais de nutrientes, sinais hormonais periféricos e sinais neurais, estes sinais refletem mudanças nos níveis de energia dos animais superiores ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Este controle é feito

através de ações coordenadas entre os diversos núcleos hipotalâmicos, entre eles o núcleo ventromedial (NVM), o núcleo paraventricular (NPV) e o núcleo arqueado (ARQ).

O ARQ possui papel de destaque no controle do comportamento alimentar e é um dos núcleos hipotalâmicos mais estudados ⁽²⁹⁻³¹⁾. Nele, há populações de neurônios que expressam neuropeptídeos que estimulam a fome (orexigênicos) e neuropeptídeos que geram saciedade (anorexigênicos) ^(29, 30). Os neurônios orexigênicos co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP), enquanto que os neurônios anorexigênicos co-expressam o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e o hormônio pro-opiomelanocortina (POMC) ^(29, 30, 32). O POMC dá origem ao hormônio estimulador de melanócitos alfa (α -MSH), que exerce papel-chave sobre a inibição da ingestão alimentar ⁽²⁸⁾. A ação destes neuropeptídeos hipotalâmicos é que determina a busca e ingestão de alimentos ou o término da alimentação.

A expressão dos neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos é modulada por sinais hormonais periféricos e pelo estado energético do indivíduo. Os hormônios insulina e leptina estão presentes em altas concentrações plasmáticas após as refeições e com o aumento de adiposidade, respectivamente, eles atuam no núcleo arqueado inibindo a expressão de NPY e AgRP e, simultaneamente, estimulando a expressão de α -MSH à partir do POMC. Isto gera redução da ingestão alimentar e aumento do dispêndio energético ⁽²⁸⁾. Além disso, há neurônios hipotalâmicos que agem como sensores de nutrientes, devido a sua capacidade de responder às mudanças na disponibilidade de nutrientes circulantes (como glicose e lipídeos) e às mudanças na concentração de moléculas intracelulares como os ácidos graxos de cadeia longa ativados (LCFA – CoA) e a malonil CoA (um precursor da síntese de ácidos graxos) ⁽³³⁻³⁵⁾.

Alguns estudos indicam que neurônios POMC, NPY e AgRP são sensíveis a mudanças na disponibilidade de nutrientes ⁽³⁵⁻³⁹⁾. Em resposta a um aumento nos níveis de nutrientes, neurônios POMC despolarizam enquanto que neurônios NPY e AgRP hiperpolarizam gerando aumento e diminuição da liberação de seus neurotransmissores, respectivamente ⁽³⁵⁻³⁹⁾. Outros estudos demonstram que durante o jejum há uma redução na concentração hipotalâmica de LCFA – CoA, e de malonil CoA, levando a uma diminuição na expressão de POMC, bem como um aumento na expressão de NPY e AgRP induzindo a ingestão de alimentos e o ganho de peso ⁽³¹⁾. Ademais, o uso da droga C75, que promove aumento na concentração de malonil CoA hipotalâmica, induziu em camundongos: bloqueio da ingestão alimentar por inibição da expressão de NPY e AgRP; aumento da expressão de POMC e perda de peso ^(31, 40).

⁴¹⁾. Desta forma, alterações na quantidade e atividade de neurônios que expressam estes neuropeptídeos podem levar a mudanças no comportamento alimentar e na homeostase energética.

Recentemente, tem sido reconhecido o papel do hipotálamo na homeostase energética através do controle do metabolismo. Por meio do sistema nervoso autônomo (SNA), o hipotálamo se comunica e modula o metabolismo energético em órgãos periféricos como o fígado, o tecido adiposo e o músculo esquelético ^(28-30, 40, 42, 43). Do hipotálamo, partem neurônios POMC que fazem sinapses com neurônios pré-ganglionares, localizados na coluna médio-lateral da medula espinal, e estes se comunicam com o músculo esquelético por meio de fibras pós-ganglionares simpáticas ^(44, 45).

O hipotálamo emite sinais que geram mudanças no metabolismo energético do músculo esquelético ⁽⁴⁰⁾. O sinal conduzido através do sistema nervoso simpático é transmitido ao músculo através da ligação de catecolaminas (noradrenalina ou adrenalina) aos receptores adrenérgicos que acoplados a proteína G, estimulam a adenilato ciclase a aumentar os níveis de adenosina 3' 5' monofosfato (AMP) e AMP cíclico (AMP-c) ^(40, 43). O aumento de AMP-c ativa a proteína quinase A (PKA) estimulando, dessa forma, a lipase sensível a hormônios (LSH) a quebrar triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos para serem oxidados na mitocôndria. O AMP ativa a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e esta catalisa a inativação da enzima acetil CoA carboxilase (ACC) levando a uma diminuição nos níveis de malonil CoA no músculo, um potente inibidor alostérico da carnitina acil transferase 1 (CAT-1) (FIGURA 1). A diminuição de malonil CoA cessa o efeito inibitório sobre a CAT-1, facilitando a entrada de LCFA-CoA na mitocôndria para ser oxidado através da β – oxidação ^(40, 43). Outra resposta metabólica muscular ao sinal hipotalâmico é a elevação da termogênese, através de aumento na expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais no músculo (UCP-3) ^(40, 43). A UCP-3 dissipa o gradiente de prótons, do espaço intermembranar mitocondrial, e produz calor ao invés de produzir ATP aumentando assim o gasto energético ⁽⁴⁶⁾.

Estudos experimentais demonstram os efeitos de sinais hipotalâmicos sobre o metabolismo no músculo esquelético ^(40, 43). Camundongos foram submetidos ao jejum ou ao jejum mais administração da droga C75, um inibidor da síntese de ácidos graxos no hipotálamo ^(40, 43). Animais que receberam C75 apresentaram maiores concentrações de malonil CoA hipotalâmica e dispêndio energético elevado no músculo ^(40, 43). Estes animais apresentaram diminuição da concentração de malonil CoA muscular e aumento na expressão de UCP-3, isto resultou numa maior taxa de oxidação de ácidos graxos ^(40, 43). Estes resultados não foram observados com a

utilização de bloqueadores adrenérgicos, isto sugere um importante e potente controle do metabolismo muscular pelo hipotálamo através do SNA ^(40, 43). Outros estudos demonstraram que alterações no SNA e na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico têm sido associadas a doenças como a diabetes mellitus tipo II e a obesidade, através de influência sobre o gasto energético ^(47, 48). Desta forma, o controle do metabolismo energético por sinais adrenérgicos parece ter importante papel na regulação do dispêndio energético e pode estar envolvido no surgimento de doenças metabólicas.

Plasticidade fenotípica, desnutrição perinatal e o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético

Tem sido demonstrado experimentalmente que a desnutrição nos períodos críticos do desenvolvimento do SNC pode induzir alterações na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos e no comportamento alimentar ^(10, 15, 49). Estudos com ratos demonstraram que restrição alimentar (30% da ingestão do controle) e desnutrição protéica (8% de caseína) durante a gestação e lactação induzem hiperfagia na prole no início da vida pos-natal e na idade adulta ^(50, 51). Da mesma forma, outros estudos evidenciaram que a desnutrição protéica (caseína 8%) na gestação e lactação induz hiperfagia na prole logo após o desmame, aos 35 dias e aos 60 dias de vida ^(15, 49). A hiperfagia destes animais foi associada com a redução da ação inibitória da serotonina na ingestão alimentar por meio de dissensibilização dos receptores 5HT_{1b} ⁽⁴⁹⁾. Foi associada também, com a maior expressão hipotalâmica de NPY e AgRP e, concomitantemente, uma menor expressão de POMC ⁽¹⁵⁾. Contudo, a partir dos 90 dias de vida não foi observada hiperfagia nos animais, mesmo assim, eles desenvolveram na vida adulta, um fenótipo de obesidade com aumento da gordura abdominal e dos níveis séricos de triglicerídeos e ácidos graxos ⁽¹⁵⁾. Isto sugere que a programação de algumas doenças metabólicas, como a obesidade, pode ter mecanismos independentes dos efeitos da desnutrição sobre o comportamento alimentar ⁽¹⁵⁾. Tendo em vista que a regulação da homeostase energética é feita também pelo hipotálamo, esta pode ser modificada, pela programação hipotalâmica induzida pela desnutrição perinatal, e contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta.

O músculo esquelético, que tem um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, também tem sido alvo de estudos sobre plasticidade fenotípica. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos da desnutrição perinatal sobre o músculo esquelético ^(9, 13, 52). A desnutrição durante a gestação parece reduzir a taxa de crescimento e o número de fibras musculares na vida adulta ⁽⁵³⁾. Ratos

jovens (4 semanas de vida), que sofreram desnutrição protéica (9% de caseína) durante a gestação, apresentaram redução no número e na densidade de fibras musculares (54). Bayol et al (2004) encontraram uma redução no número de núcleos dos músculos semitendinoso e gastrocnêmio indicando uma diminuição na proliferação celular em ratos jovens que sofreram restrição de dieta no período de gestação (40% da dieta consumida pelos controles). Estudos epidemiológicos demonstram que as mudanças no fenótipo da composição corporal estão associadas ao aumento do percentual de gordura corporal e a redução na massa muscular na vida adulta ⁽⁵⁵⁾. Tem sido especulado que alterações no crescimento e desenvolvimento de fibras musculares podem ser um dos mecanismos subjacentes à programação de doenças metabólicas ⁽⁵⁶⁾.

Alterações sobre o tecido muscular parecem atuar como um potencial fator etiológico da resistência à insulina e de doenças como obesidade e diabetes mellitus ^(5, 11, 53). Estudos experimentais demonstram que filhotes de ratas expostas à desnutrição protéica (8% de caseína) durante a gestação e lactação apresentam resistência à insulina na idade adulta ^(5, 11). Nestes animais, a resistência à insulina foi associada a uma redução na expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4), proteínas p85 e p110 β (sub-unidades da fosfatidilinositol 3-quinase) e de proteína kinase C zeta (PKC ζ) ^(5, 11). Estas proteínas estão envolvidas positivamente com a propagação do sinal intracelular da insulina, com a translocação do GLUT-4 e com o transporte de glicose através da membrana sarcoplasmática ^(5, 11). A resistência à insulina também está associada à concentração elevada de triglicerídeos plasmáticos e intramusculares (TGIM) ^(57, 58). O aumento de TGIM eleva o conteúdo LCFA-CoA e diacilglicerol (DAG) ⁽⁵⁹⁾, este último atua inibindo a propagação do sinal intracelular da insulina ^(58, 60). O DAG estimula a proteína kinase C teta (PKC θ) a inativar o substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) através de fosforilação do seu resíduo serina ^(58, 60). Desta forma, alterações na expressão de proteínas da cascata de sinalização da insulina, bem como, aumento nos níveis de lipídeos, como observado em animais desnutridos no período perinatal ^(14, 15), comprometem a tolerância e a captação de glicose no músculo esquelético.

Além dos efeitos diretos no músculo, sobre a morfologia e a sensibilidade à insulina, é possível que a desnutrição perinatal modifique o metabolismo muscular através da alteração do controle hipotalâmico via SNA. Os danos induzidos pela desnutrição no início da vida, sobre o controle hipotalâmico do metabolismo energético no músculo podem ser originados por alterações nos sensores nutricionais hipotalâmicos e na expressão de seus neuropeptídeos, bem como na transmissão do sinal simpático através da ligação e sinalização das catecolaminas nos receptores

adrenérgicos muscular (FIGURA 2). Um estudo demonstrou que desnutrição perinatal (8% de caseína) induziu alteração na expressão de genes envolvidos na regulação de sensores de nutrientes hipotalâmicos e no controle do metabolismo ⁽¹⁴⁾. Com isso, lançamos o questionamento de que animais desnutridos no período perinatal podem apresentar redução do metabolismo energético muscular em decorrência de alterações no controle hipotalâmico que resulta em menor densidade e/ou menor responsividade de receptores adrenérgicos, menor expressão de UCP-3 e menor atividade de enzimas envolvidas na oxidação de lipídeos. Além de apresentar aumento da esterificação de ácidos graxos com acúmulo de triglicerídeos. Isto poderia explicar os resultados encontrados em ratos submetidos à desnutrição perinatal que não apresentaram hiperfagia na vida adulta, contudo, desenvolveram obesidade e apresentaram aumento da gordura abdominal, dos níveis de triglicerídeos e ácidos graxos plasmáticos ^(14, 15).

Conclusão

Em resposta a estímulos ou insultos ambientais, a plasticidade fenotípica possibilita a ocorrência de mudanças comportamentais, estruturais e metabólicas no indivíduo. A desnutrição no início da vida induz alterações no músculo esquelético, no comportamento alimentar e no perfil lipídico. Tendo em vista que os lipídios podem modular a expressão de neuropeptídeos e sinais hipotalâmicos que modulam o comportamento alimentar e o metabolismo energético periférico, é possível que alterações induzidas pela desnutrição perinatal no metabolismo muscular sejam originadas por falha no controle do metabolismo energético pelo hipotálamo. Desta forma, a programação do controle hipotalâmico sobre o metabolismo energético muscular através da comunicação hipotálamo-músculo pode favorecer o desenvolvimento de obesidade e co-morbidades associadas com a desnutrição no início da vida.

Referências

1. Winick M, Rosso P, Brasel JA. Malnutrition and cellular growth in the brain. *Bibl Nutr Dieta*. 1972(17):60-8.
2. Dobbing J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1964 Feb 18;159:503-9.
3. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992 Jul;35(7):595-601.

4. Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med.* 1977 Jun;31(2):91-5.
5. Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia.* 2005 Mar;48(3):547-52.doi:10.1007/s00125-005-1669-7.
6. Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.* 1999 Apr;31 Suppl 1:3-6.
7. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 12;295(7):349-53.
8. Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C. The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr.* 2005 Jul;1(3):130-41.doi:MCN20 10.1111/j.1740-8709.2005.00020.x.
9. Wilson SJ, Ross JJ, Harris AJ. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development.* 1988 Apr;102(4):815-21.
10. Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides.* 2000 Feb;34(1):1-6.doi:10.1054/npep.1999.0778 S0143-4179(99)90778-3.
11. Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, et al. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol.* 2003 May;177(2):235-41.
12. Orozco-Solis R, Matos RJ, Guzman-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihouee A, Houlgatte R, et al. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One.* 2010;5(10):e13537.doi:10.1371/journal.pone.0013537.
13. Toscano AE, Manhaes-de-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 2008 Mar;24(3):270-8.doi:S0899-9007(07)00357-7 10.1016/j.nut.2007.12.004.
14. Orozco-Solis R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhaes de Castro R, et al. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond).* 2010 Nov 9.doi:ijo2010223 10.1038/ijo.2010.223.
15. Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the

developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009 Mar 2;96(3):481-92.doi:S0031-9384(08)00377-6 10.1016/j.physbeh.2008.11.016.

16. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50; discussion -5.

17. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature.* 2004 Jul 22;430(6998):419-21.doi:10.1038/nature02725.

18. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Sep;193(3 Pt 2):1224-32.doi:S0002-9378(05)00720-9 10.1016/j.ajog.2005.05.041.

19. Toscano AE, Amorim MA, de Carvalho Filho EV, Aragao Rda S, Cabral-Filho JE, de Moraes SR, et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci.* 2008 May 23;82(21-22):1131-6.doi:S0024-3205(08)00139-2 10.1016/j.lfs.2008.03.013.

20. Toscano AE, Ferraz KM, Castro RM, Canon F. Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(12):1363-9.doi:S1807-59322010001200022 [pii].

21. Barreto Medeiros JM, Cabral Filho JE, De Souza SL, Freitas Silva SR, Mendes Da Silva C, Deiro TC, et al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci.* 2002 Jun;5(3):211-4.

22. Falcão-Tebas F, Bento-Santos A, Amorim MF, 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. *British Journal of Nutrition.* 2011 INPRESS.

23. Costa-Cruz RR, Amancio-dos-Santos A, Guedes RC. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett.* 2006 Jul 3;401(3):271-5.

24. Do Monte-Silva KK, Assis FL, Leal GM, Guedes RC. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. *Nutr Neurosci.* 2007 Jun-Aug;10(3-4):187-94.

25. Wauben IP, Wainwright PE. The influence of neonatal nutrition on behavioral development: a critical appraisal. *Nutr Rev.* 1999 Feb;57(2):35-44.

26. Blundell J. Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Apr;12(4):147-57.

27. Nagase H, Nakajima A, Sekihara H, York DA, Bray GA. Regulation of feeding behavior, gastric emptying, and sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue by galanin and enterostatin: the involvement of vagal-central nervous system interactions. *J Gastroenterol.* 2002 Nov;37 Suppl 14:118-27.
28. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661-71.doi:10.1038/35007534.
29. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 2001 Nov-Dec;74(4-5):683-701.doi:S0031938401006126.
30. Mercer JG, Speakman JR. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 Mar;25(2):101-16.doi:S0149-7634(00)00053-1.
31. Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):66-71.doi:10.1073/pnas.012606199.
32. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):289-95.doi:nature05026 10.1038/nature05026.
33. He W, Lam TK, Obici S, Rossetti L. Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci.* 2006 Feb;9(2):227-33.doi:nn1626 10.1038/nn1626.
34. Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 28;100(22):12624-9.doi:10.1073/pnas.1834402100.
35. Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Ronnekleiv OK, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology.* 2003 Apr;144(4):1331-40.
36. Blouet C, Jo YH, Li X, Schwartz GJ. Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J Neurosci.* 2009 Jul 1;29(26):8302-11.doi:29/26/8302 10.1523/JNEUROSCI.1668-09.2009.
37. Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Penicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes.* 2007 May;56(5):1219-27.doi:db06-0567 10.2337/db06-0567.

38. Jo YH, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S, Jr. Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J Neurophysiol.* 2009 May;101(5):2305-16.doi:91294.2008 10.1152/jn.91294.2008.
39. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature.* 2007 Sep 13;449(7159):228-32.doi:nature06098 10.1038/nature06098.
40. Cha SH, Hu Z, Chohnan S, Lane MD. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14557-62.doi:0507300102 10.1073/pnas.0507300102.
41. Gao S, Lane MD. Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5628-33.doi:10.1073/pnas.1031698100.
42. Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Dec;25 Suppl 5:S56-62.doi:10.1038/sj.ijo.0801915.
43. Cha SH, Rodgers JT, Puigserver P, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15410-5.doi:0607334103 10.1073/pnas.0607334103.
44. Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med.* 2005 Oct;258(4):301-27.doi:JIM1553 10.1111/j.1365-2796.2005.01553.x.
45. Cechetto DF, Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1988 Jun 22;272(4):579-604.doi:10.1002/cne.902720410.
46. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.* 2000 Jul 27;406(6794):415-8.doi:10.1038/35019082.
47. Eikelis N, Esler M. The neurobiology of human obesity. *Exp Physiol.* 2005 Sep;90(5):673-82.doi:expphysiol.2005.031385 10.1113/expphysiol.2005.031385.
48. Hesselink MK, Mensink M, Schrauwen P. Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obes Res.* 2003 Dec;11(12):1429-43.doi:10.1038/oby.2003.192.
49. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008 Mar;27(6):1400-8.doi:EJN6105 10.1111/j.1460-9568.2008.06105.x.

50. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jul;279(1):E83-7.
51. Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Sep;297(3):R813-24.doi:00201.2009 10.1152/ajpregu.00201.2009.
52. Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr.* 2004 Mar;91(3):331-9.doi:10.1079/BJN20031070S0007114504000455.
53. Brameld JM. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *Br J Nutr.* 2004 Mar;91(3):327-8.doi:10.1079/BJN20031077S0007114504000431.
54. Mallinson JE, Sculley DV, Craigon J, Plant R, Langley-Evans SC, Brameld JM. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br J Nutr.* 2007 Aug;98(2):292-9.doi:S0007114507701678 10.1017/S0007114507701678.
55. Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, Patel M, Jackson AA, Elia M. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *Am J Clin Nutr.* 2005 Nov;82(5):980-7.doi:82/5/980.
56. Fahey AJ, Brameld JM, Parr T, Buttery PJ. The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J Anim Sci.* 2005 Nov;83(11):2564-71.doi:83/11/2564.
57. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002 Jan;51(1):7-18.
58. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 2007 Apr;87(2):507-20.doi:87/2/507 10.1152/physrev.00024.2006.
59. van Loon LJ, Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch.* 2006 Feb;451(5):606-16.doi:10.1007/s00424-005-1509-0.
60. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Apr 15;212(2):167-78.doi:S0041-008X(06)00028-7 10.1016/j.taap.2006.01.003.

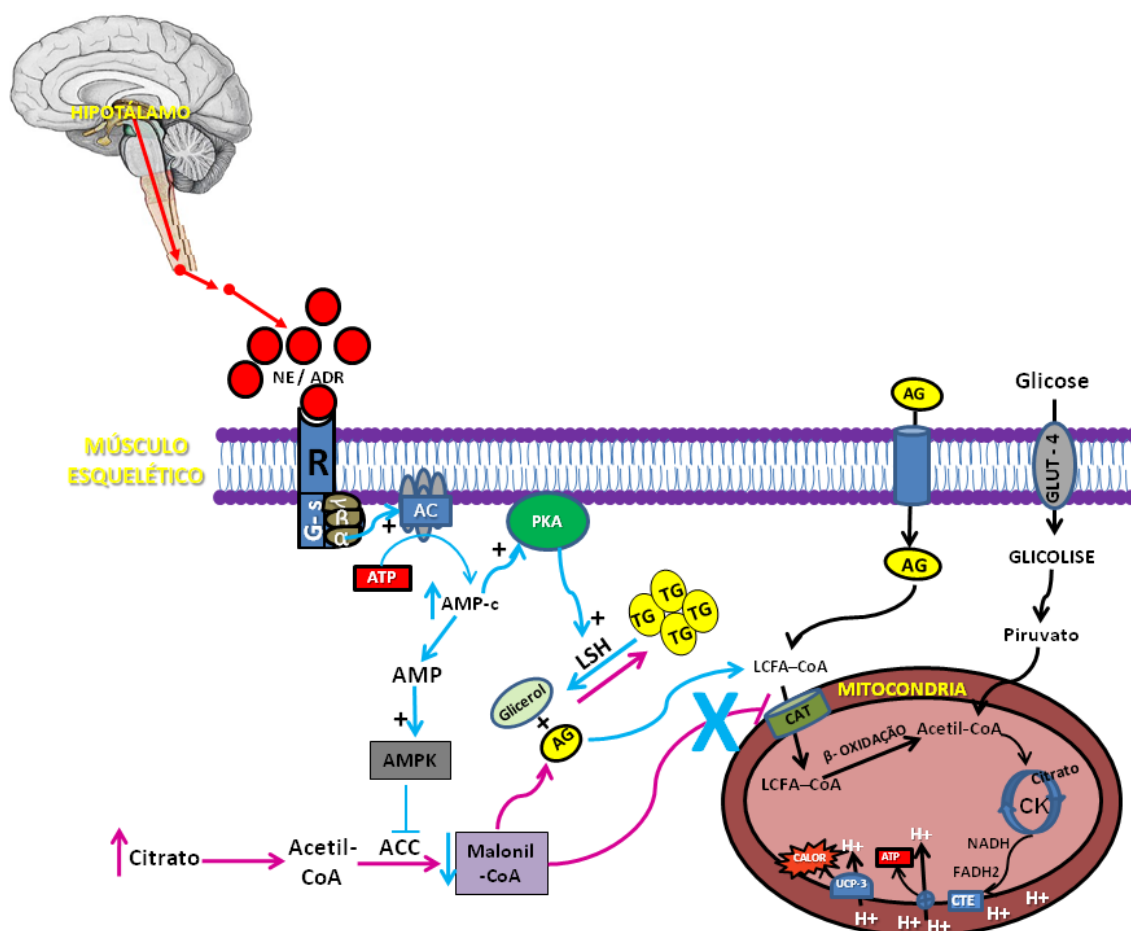


FIGURA 1 (mencionada na pag. 7). Modulação do metabolismo energético muscular por meio de sinais adrenérgicos. As setas em azul representam os efeitos intracelulares gerados pela propagação do sinal adrenérgico no músculo, enquanto que, as setas em rosa demonstram os efeitos induzidos pelo aumento da concentração de citrato, em decorrência do estado energético positivo. NE, noradrenalina; ADR, adrenalina; R, receptor adrenérgico; G-s, proteína G estimulatória; AC, adenilato ciclase; ATP, trifosfato de adenosina; AMP-c, AMP cíclico; AMP, adenosina 3' 5' monofosfato; AMPK, proteína cinase dependente de AMP; ACC, acetil CoA carboxilase; PKA, proteína cinase A; LSH, lipase sensível a hormônio; TG, triglicerídeos; AG, ácidos graxos; LCFA-CoA, ácidos graxos de cadeia longa ativados; CAT, complexo carnitina acil-transferase; CK, ciclo de Krebs; CTE, cadeia transportadora de elétrons; UCP-3, proteína desacopladora; GLUT-4, transportador de glicose.

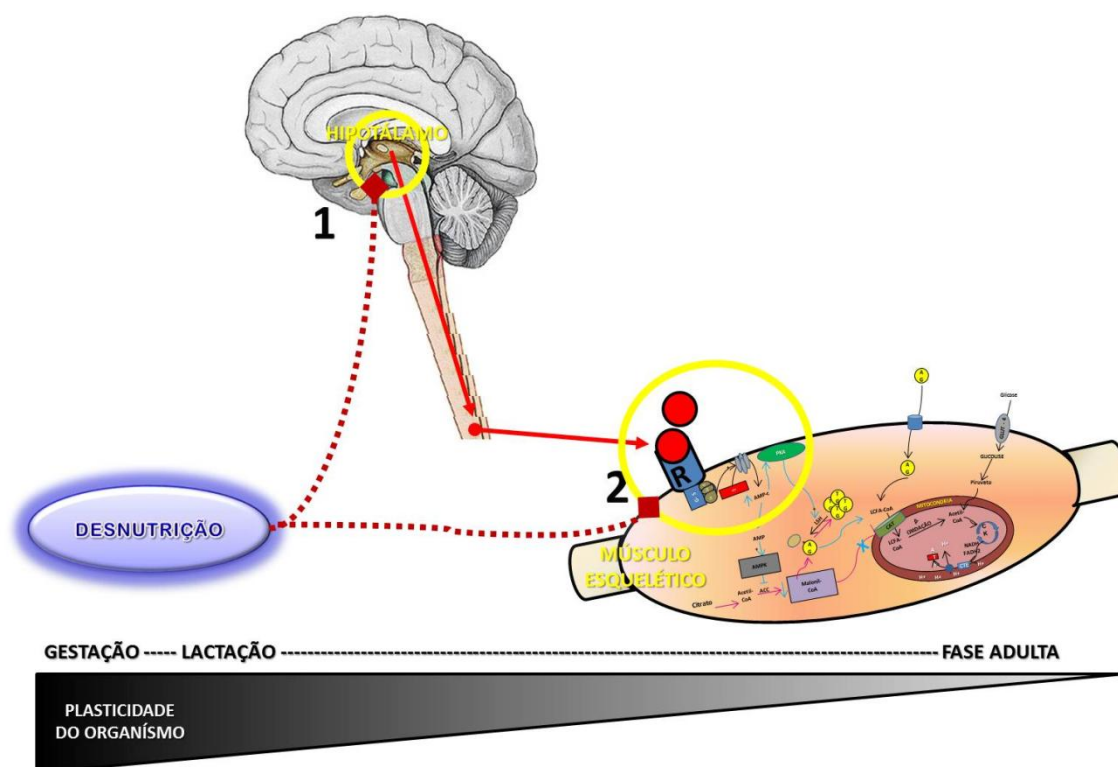


FIGURA 2 (mencionada na pág. 10). Desnutrição nos períodos de alta plasticidade do organismo pode induzir alterações no hipotálamo e no músculo esquelético e, na idade adulta, repercutir no controle hipotalâmico do metabolismo muscular, via sistema adrenérgico. Dentre os locais cuja desnutrição perinatal parece induzir alterações estão: 1 – sensores de nutrientes hipotalâmicos; 2 – ligação e sinalização das catecolaminas nos receptores adrenérgicos musculares.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Avaliar em ratos adultos, os efeitos da desnutrição protéica perinatal no metabolismo energético do músculo esquelético isolado submetido à estimulação adrenérgica.

3.2. Específicos:

- Verificar os efeitos da desnutrição protéica perinatal em ratos sobre:
 - O peso corporal e o consumo alimentar das ratas durante o período de gestação e lactação;
 - O Peso corporal, comprimento corporal e o índice de massa corporal na prole de ratos do desmame até os 90 dias de idade;
 - As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol e proteínas totais da prole adulta;
 - As concentrações séricas dos hormônios leptina e insulina da prole adulta;
- Verificar os efeitos da estimulação adrenérgica no músculo esquelético, de ratos submetidos à desnutrição perinatal sobre:
 - Atividade de enzimas do metabolismo dos ácidos graxos e dos carboidratos (β -HAD, citrato sintase e PFK) nos músculos sóleo e EDL;

4. HIPÓTESES

- A desnutrição protéica perinatal induz redução do metabolismo dos ácidos graxos no músculo esquelético de ratos adultos.
- O músculo isolado de animais submetidos à desnutrição protéica perinatal apresentam uma hiporesponsividade frente à estimulação com agonistas adrenérgicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar, provenientes de 12 ratas, da colônia do Departamento de Nutrição 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 invertido de 12/12 horas e livre acesso à água e alimentação. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Biológicas (protocolo nº 23076.049076/2010-35), da Universidade Federal de Pernambuco. A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2. Escolha das ratas para o acasalamento

Foram utilizadas 12 ratas como progenitoras, e para escolha das ratas foram utilizados alguns critérios: 1) as ratas não poderiam ter parentesco familiar, 2) possuir idade entre 90 e 120 dias de vida, 3) apresentar peso entre 220 e 250 gramas e 4) serem primíparas. Estes cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados (Bautista, Garcia-Torres et al. ; Zambrano, Bautista et al. 2006). Em seguida, foi realizado um mapeamento do ciclo estral das ratas, através de esfregaço vaginal, e no período estro as fêmeas foram postas para acasalar (Marcondes, Bianchi et al. 2002).

5.3. Manipulação da dieta das ratas e formação dos grupos experimentais

Após a confirmação da gestação, através da técnica de esfregaço vaginal (Marcondes, Bianchi et al. 2002), foram formados aleatoriamente dois grupos, com base na manipulação dietética das ratas: controle (C, n=6; caseína a 17%) e desnutrido (LP, n=6; caseína a 8%). As dietas confeccionadas são isocalóricas com alteração apenas no

conteúdo de proteína (Quadro 1). As ratas receberam estas dietas durante todo o período de gestação e lactação. No primeiro ciclo escuro, após o nascimento, foi realizada a sexagem dos filhotes, pesagem da ninhada e foi mantido um número de 8 filhotes por ninhada durante todo o período de lactação. Aos 22 dias de vida foi realizado o desmame dos animais e eles passaram a receber dieta padrão de biotério. Somente os filhotes machos foram utilizados para as avaliações posteriores.

Quadro 1. Composição centesimal da dieta à base de caseína (AIN-93G**).

CASEÍNA a 8%		CASEÍNA a 17%	
Ingredientes	Quantidade por Kg de ração	Ingredientes	Quantidade por Kg de ração
Caseína	79,30g	Caseína	179,30g
Mix de vitamina	10,00g	Mix de vitamina	10,00g
Mix de sais minerais	35,00g	Mix de sais minerais	35,00g
Celulose	50,00g	Celulose	50,00g
Óleo de soja	70ml	Óleo de soja	70ml
Bitartarato de colina	2,50 g	Bitartarato de colina	2,50 g
DL-metionina	3,00g	DL-metionina	3,00g
Amido	750,20g	Amido	650,20g

(**) fonte: (Reeves, Nielsen et al. 1993).

5.4. Avaliação do peso corporal e consumo alimentar das mães

O peso corporal e o consumo alimentar foram avaliados durante todo período de gestação e lactação. O consumo alimentar foi determinado como previamente descrito (Toste, de Moura et al. 2006). O consumo alimentar relativo ao peso foi calculado de acordo com a formula: $\text{Consumo Relativo (mg/g)} = \text{consumo alimentar (mg)} / \text{peso corporal (g)}$. O peso corporal e o peso do alimento foram mensurados em balança (Marte Scale AS-1000 com sensibilidade de 0.01-g).

5.5. Avaliação dos parâmetros biométricos da prole

O peso corporal e o comprimento corporal da prole foram avaliados a cada 10 dias do desmame até os 90 dias de idade. Com estes dados foi calculado o Índice de Massa

Corporal (BMI) dividindo o peso corporal (g) pelo comprimento ao quadrado (cm²). O percentual de ganho de peso corporal foi calculado tendo como base o peso do 1º dia de avaliação, segundo a fórmula:

$$\% \text{ ganho de peso} = [\text{Peso do dia (g)} \times 100 / \text{Peso do 1º dia (g)}] - 100$$

A avaliação do peso corporal foi feita através de balança (Marte Scale AS-1000 com sensibilidade de 0·01-g).

5.6. Avaliações bioquímicas e hormonais do soro de ratos adultos

Aos 97±3 dias de idade os ratos foram submetidos a um jejum de 12hs e em seguida foram sacrificados por meio de decapitação. Logo em seguida, foi coletado o sangue e centrifugado durante 20 minutos, a 3000 rpm e 25°C. Posteriormente, foi separado o soro para realizar a avaliação do perfil bioquímico (glicose, colesterol, triglicerídeos e proteínas totais) e das concentrações dos hormônios Leptina e Insulina. Ambos leptina e insulina foram avaliados através de kits de ELISA comercialmente disponíveis (Enzo Life Science, São Paulo, Brasil; e Millipore, São Paulo, Brasil, respectivamente). Os níveis séricos de proteínas totais, glicose, triglicerídeos e colesterol foram avaliados através de kits LabTest (Minas Gerais, Brasil). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

5.7. Procedimentos experimentais para estimulação adrenérgica no músculo esquelético isolado

No dia do sacrifício, os animais foram pesados e sacrificados numa sequência alternada entre os grupos, foram removidos rapidamente os músculos sóleo e EDL. Em seguida, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital (Marte Scale AS-1000 com sensibilidade de 0·01-g), e foram mantidos a comprimento de repouso com seus tendões fixos, através de linha, em equipamento para banho de órgãos isolados

Insight (São Paulo, Brasil) (Figura 1). Eles foram incubados a 37°C em solução tampão Krebs Ringer Bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828 Mm de KCl; 1,2 mM de MgSO₄; 1,212 mM de KH₂PO₄; 2,4 mM de CaCl₂; 5mM de glicose e pH 7,4) e aerados com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A manutenção dos músculos nestas condições foi adotada para possibilitar a difusão de oxigênio e nutrientes, evitando a anóxia das fibras musculares centrais. Dessa forma, a proteólise muscular é reduzida, há manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo in vitro as características dos músculos em crescimento in vivo (KETTELHUT, 1988, 1994).

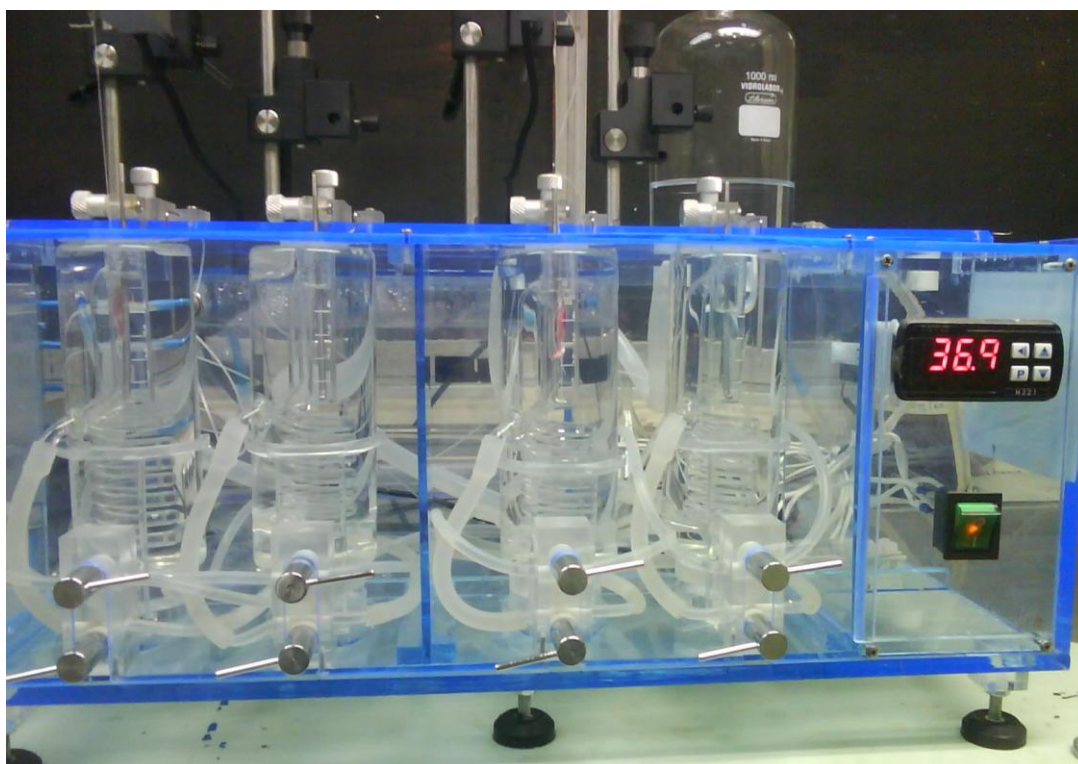


Figura 1: Equipamento de banho de órgãos isolados.

Os tecidos foram pré-incubados por 1 hora em solução Krebs Ringer, e incubado por 2 horas em nova solução de idêntica composição e na presença de agonistas adrenérgicos e/ou ácido ascórbico (Navegantes, Resano et al. 1999). Assim, formaram-se seis grupos experimentais, de acordo com a manipulação nutricional de suas mães e a exposição dos músculos as drogas (Figura 2): músculos de animais Cp e LPp que foram expostos ao α -agonista (Cp + α , n=6; e LPp + α , n=6); músculos de

animais Cp e LPp que foram expostos ao β -agonista (Cp + β , n=6; e LPp + β , n=6); e músculos de animais Cp e LPp que não foram expostos a nenhum dos dois agonistas (Cp, n=6; e LPp, n=6). Os grupos Cp + α e LPp + α foram expostos a fenilefrina 10^{-5} M e os grupos Cp + β e LPp + β foram expostos ao isoproterenol 10^{-5} M. Nos experimentos com fenilefrina e isoproterenol, 10 mM de ácido ascórbico foi adicionado à incubação para prevenir a oxidação da droga (Navegantes, Resano et al. 2004). Desta forma, seus respectivos controles (Cp e LPp) foram expostos a ácido ascórbico 10 mM.

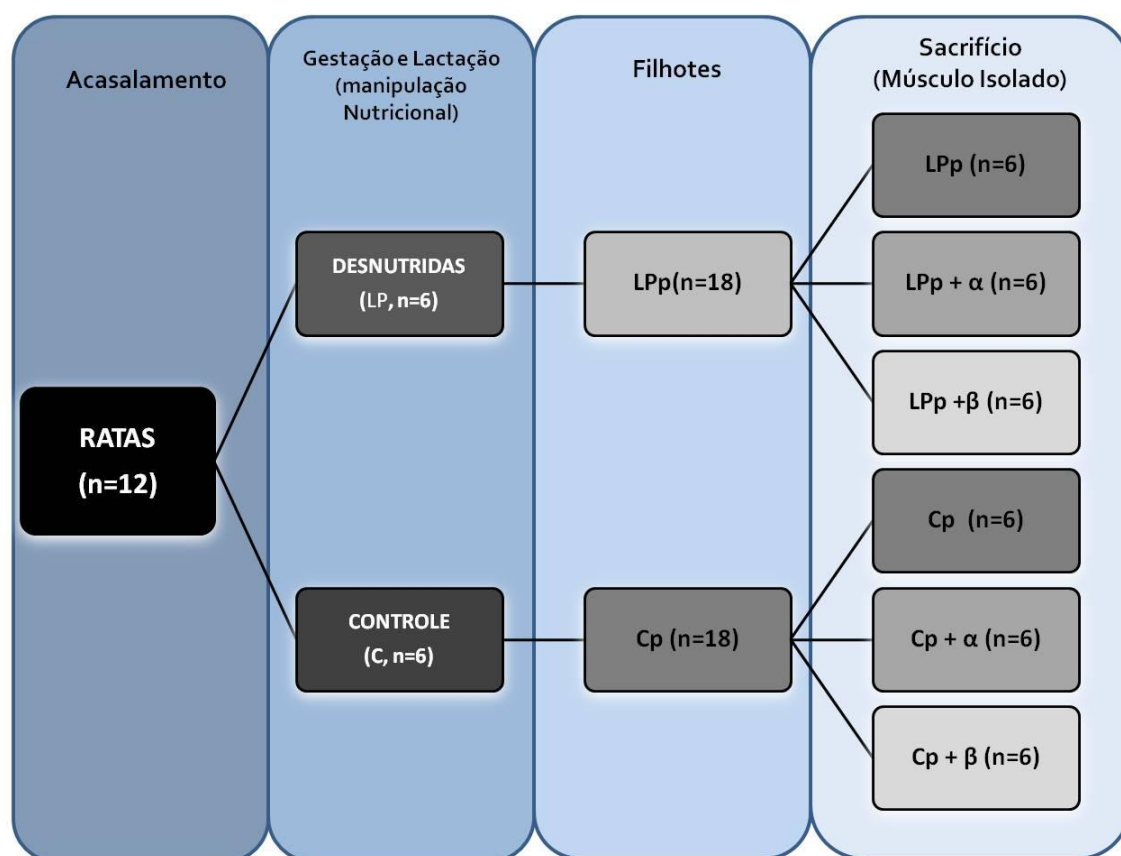


Figura 2: Formação dos grupos experimentais de acordo com a manipulação nutricional das ratas e exposição dos músculos da prole aos α e β agonistas adrenérgicos. LP e C (ratas submetidas durante toda gestação e lactação, a uma dieta caseína 8% e caseína 17%, respectivamente). LPp (filhotes de mães LP). Cp (filhotes de mães C). Cp + α e LPp + α (músculos dos respectivos grupos que foram expostos a fenilefrina 10^{-5} mM + ácido ascórbico 10mM). Cp + β e LPp + β (músculos dos respectivos grupos que foram expostos a isoproterenol 10^{-5} mM + ácido ascórbico 10mM). Cp e LPp (músculos dos respectivos grupos que foram expostos a ácido ascórbico 10 mM).

5.8. Drogas e Reagentes

Todas as drogas e reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA 95060 USA), e Sovereign (São Paulo, Brasil). O isoproterenol, a fenilefrina e o ácido ascórbico foram dissolvidos em água destilada e estocados a -20°C .

5.9. Ensaios enzimáticos no músculo esquelético

Para os ensaios enzimáticos, inicialmente, os músculos sóleo e EDL foram previamente congelados à -80°C até as análises. Os músculos foram homogeneizados usando um homogeneizador de amostras Tecnal (São Paulo, Brasil) em tampão de extração (100mM-tris base, 10mM-EDTA, 2mM-PMSF, 10mM ortovanadato de sódio). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade da citrato sintase, fosfofrutokinase (PFK) e β -hidroxiacildesidrogenase (β -HAD) foram determinadas como descritas previamente (Opie and Newsholme 1967; Ardawi and Newsholme 1982; Heilbronn, Gan et al. 2007). A citrato sintase, a β -HAD e a PFK foram medidas a um comprimento de onda de 415nm, 340nm e 340nm, respectivamente. Todas as mensurações foram realizadas usando um Espectrofotômetro Visível – UV (Thermo Scientific, USA) a 25°C . As atividades das enzimas estão descritas em micromoles por minuto por micrograma de proteínas.

5.10. Análises Estatística

Cada grupo experimental foi formado por animais de diferentes ninhadas, ou seja, os animais não são irmãos. Esta atitude foi tomada para que os resultados dos nossos experimentos pudessem sofrer a mínima influência dos “*effect of litter*” (Haseman and Hogan 1975; Holson and Pearce 1992; Zorrilla 1997). Inicialmente, os

dados foram testados segundo sua normalidade de distribuição. Para avaliar os efeitos da desnutrição perinatal sobre as diferentes variáveis foi utilizado o test t de Student's. O coeficiente de correlação de Pearson's foi usado para correlacionar o número de filhotes nascidos e o ganho de peso das mães durante a gestação. Para avaliar os efeitos intra-grupos, os dados foram analisados pelo teste ANOVA one-way. Tukey's foi usado como pós-teste. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM e a significância estatística foi estabelecida $P < 0.05$. A análise dos dados foi realizada usando o programa estatístico GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

6. RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL

Title: Perinatal low protein diet-induced predictive changes on the metabolism of isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation

Running title: Predictive adaptive changes in skeletal muscle

Authors:

Adriano Bento-Santos^b, Jéssica Priscila Fragoso de Moura^a, José Antônio dos Santos^b, Filippe Tebas-Falcão^{a,c}, Francisco Bolaños-Jiménez^d, Cláudia Jacques Lagranha^c, José Cândido Ferraz^c, João Henrique Silva, Raul Manhães-de-Castro^{a,b}, Carol Góis Leandro^{a,c*}

^a Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^b Department of Neuropsychiatry and Behavioral Science, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^c Department of Physical Education and Sports Science, CAV, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^dINRA, UMR1280 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Université de Nantes, Nantes Atlantique Université, Nantes, France,

Mailing address:

Carol Góis Leandro

Rua Prof. Moraes Rego, 1235 – CEP: 50670-901 – Departamento de Nutrição - Cidade Universitária - Recife, PE – Brasil.

Telephone: (00 55 81) 21268463. Fax: (00 55 81) 21268473

* **E-mail:** carolleandro22@gmail.com

ABSTRACT

Aim: To verify the long-last effects of a perinatal low-protein diet on the isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation in rats. Our hypothesis is that perinatal low-protein diet causes lower activity of some enzymes of the glucose and fatty acid metabolism and these effects depends on muscle type.

Methods: Male Wistar rats were divided in two groups according to their mother's diet during gestation and lactation: control (17% casein, Cp) and low-protein (8% casein, LPp). At 100 d old, animals were sacrificed and serum insulinemia, leptinemia, glycaemia, triglycerides, cholesterol and total protein were analyzed. The *soleus* and *extensor digitalis longus* (EDL) muscles were removed and incubated for two hours with phenylephrine 10^{-5} M, a selective α_1 -adrenergic receptor agonist, or isoprenaline 10^{-5} M, a β_1 - and β_2 -adrenoreceptor agonist. Enzymatic activity of citrate synthase (CS), phosphofructokinase (PFK) and β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase (β -HAD) were evaluated.

Results: There were no differences in the biochemical parameters in animals from both groups. Serum insulin (Cp= 0.55 ± 0.10 ; LPp= 0.54 ± 0.12 ; $p=0.96$) and leptin: Cp= 0.90 ± 0.07 ; LPp= 0.81 ± 0.08 ; $p=0.45$) did not alter. Maternal low-protein diet induced a decrease the activity of β -HAD in soleus muscle even when stimulated with isoprenaline or phenylephrine. Low protein diet induced an increase in the activity of PFK and CS. In response to isoprenaline, there was a reduced activity of the enzyme PFK and an increased activity of the β -HAD.

Conclusions: The present study showed that perinatal protein malnutrition program energy metabolism differently in two types of skeletal muscles submitted to adrenergic stimulation.

Key words: Developmental Plasticity, Metabolism, Enzyme activity, Adrenoreceptors, Skeletal Muscle,

INTRODUCTION

Epidemiological and experimental studies have demonstrated that there is a relationship between unbalanced nutrient intake during perinatal life and subsequent development of adult metabolic disease (OZANNE, DORLING *et al.*, 2001; GLUCKMAN, HANSON *et al.*, 2005). This phenomenon is termed “developmental plasticity” that refers to the property of a given genotype to produce different phenotypes in response to distinct environmental conditions (HANSON, GODFREY *et al.*, 2011). The maternal low-protein diet model is one of the most extensively studied models of developmental plasticity (OZANNE e HALES, 2004). A low-protein diet (8% casein) during gestation followed by a normal diet throughout the life-course was associated with growth restriction, slightly elevated systolic blood pressures and increased fasting plasma insulin concentrations compared to control offspring (OZANNE e HALES, 2004). If maternal protein restriction is continued during lactation, there is lasting growth restriction, age-dependent loss of glucose tolerance, insulin resistance, hypertension and hyperleptinaemia, even when the offspring are weaned onto a control diet (OZANNE e HALES, 2004).

During growth period (after weaning), perinatal undernutrition leads to rapid catch-up growth with asymmetric reduction in organ growth, such that growth of liver is reduced, whereas that of heart and brain is spared (OZANNE, DORLING *et al.*, 2001). Our previous studies using rats demonstrate that perinatal low-protein diet may influence brain growth spurt, feeding behavior and ontogeny of reflexes (BARRETO-MEDEIROS, FEITOZA *et al.*, 2004; LOPES DE SOUZA, OROZCO-SOLIS *et al.*, 2008; FALCAO-TEBAS, BENTO-SANTOS *et al.*, 2011). Although increasing evidence indicates that neural systems maintain some degree of plasticity throughout life, early environmental factors influence neural development (YOUNG, 2006). For

example, sympathoadrenal system may be altered permanently by variations in glucocorticoid exposure, maternal stress, glucocorticoid administration and maternal ingestion of a protein-restricted diet (YOUNG, 2006). Circulating catecholamine concentrations and subcutaneous and intra-abdominal adipocytes adrenoceptor expression were altered in 12-week-old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet during pregnancy and lactation (PETRY, OZANNE *et al.*, 2000). Maternal low-protein diet throughout pregnancy and lactation reduced β -adrenergic responsiveness and attenuated adrenergic and insulin signaling, suggesting that intrauterine undernutrition induces heart failure risk of the 3-mo-old male offspring (FERNANDEZ-TWINN, EKIZOGLU *et al.*, 2006).

Catecholamines stimulate the substrate oxidation (glucose and fatty acid) and have a marked effect on protein metabolism in skeletal muscle (BARKER e SAITO, 1981). Histochemical observation suggests that this effect is muscle-specific, with more anabolic effects on the extensor digitorum longus (EDL), a classical fast-twitch muscle (NAVEGANTES, BAVIERA *et al.*, 2009). It is well known that most of the metabolic actions of the sympathetic activation in the skeletal muscle are exerted through a β -adrenoceptor-mediated increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and subsequent activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA), which mediates the activity of some enzymes in the metabolism. Isoprenaline is a β_1 - and β_2 -adrenoreceptor agonist (NAVEGANTES, BAVIERA *et al.*, 2009). On the other hand, α_1 -adrenergic receptors, via activation of inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), interact with calcium channels of endoplasmic and sarcoplasmic reticulum with subsequent activation of calcium-dependent protein kinase (PKC), which mediates the activity of some enzymes in the metabolism. Phenylephrine is a selective α_1 -adrenergic receptor agonist (NAVEGANTES, BAVIERA *et al.*, 2009).

Since sympathoadrenal system plays an important role in the regulation of metabolic disorders (obesity, type II diabetes and hypertension), it is expected that perinatal low-protein diet has a major impact on the response of skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation. In the present study, we verified the long-last effects of a perinatal low-protein diet on the isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation. Our hypothesis is that perinatal low-protein diet causes lower activity of some enzymes of the glucose and fatty acid metabolism and these effects depends on muscle type. Thus, the main goal of this study was to evaluate the effects of a maternal low-protein diet on the activity of key enzymes of glucose metabolism (citrate synthase [CS], and phosphofructokinase [PFK]) and fatty acid (β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase (β -HAD) which catalyzes the third step of β -oxidation of fatty acid) in soleus (oxidative) and EDL (glycolitic) muscles submitted to adrenergic stimulation.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Biological Science Center (protocol nº 23076.049076/2010-35), Federal University of Pernambuco, Brazil, and all experiments were performed in accordance with the recommendations of the Brazilian Committee of Animal Experimentation (COBEA).

Animals and diet

Virgin female Wistar rats aged 100 - 120 d and weighting 235 ± 10 g from the animal colony of the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil, were maintained in a controlled environment (room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, light–dark cycle 06.00–18.00 h) and mated with males in a proportion of 2 females for 1 male. The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear, designated as day

0 of pregnancy, pregnant rats were transferred to individual cages and randomly divided into two experimental groups of six animals each: a control group (C) fed a 17% casein diet and a Low-Protein (LP) diet group fed an 8% casein diet. Both diets were provided *ad libitum* during pregnancy and lactation (REEVES, NIELSEN *et al.*, 1993). The mother's body weight and food intake were evaluated weekly throughout gestation and lactation. After birth, in the first dark cycle (first day of life), litter's size and weight were recorded and the number of suckling pups was adjusted to eight pups per dam. At weaning (22 days after delivery), eighteen male offspring of each experimental group selected at random were housed three per cage and fed standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein and 4% lipids; Nuvilab CR1-Nuvital ®). Food and water were provided *ad libitum*. Animals sacrificed at 100 days of age after a fasting period of 12 hours and their trunk blood was collected for the quantification of insulin, leptin, glucose, triglycerides, cholesterol and total protein. Visceral fat mass (mesenteric, epididymal and retroperitoneal white adipose tissue), was excised and immediately weighed for evaluation of central adiposity (TOSTE, DE MOURA *et al.*, 2006). The *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were removed and incubated to be submitted to adrenergic stimulation. Six more experimental groups were formed according to pharmacological manipulation: muscle from Cp animals treated with α -agonist (Cp + α , n=6); muscle from Cp animals treated with β -agonist (Cp + β , n=6); muscle from Cp animals treated with ascorbic acid (Cp, n=6); muscle from LPp animals treated with α -agonist (LPp + α , n=6); muscle from LPp animals treated with β -agonist (LPp + β , n=6); and muscle from LPp animals treated with ascorbic acid (LPp, n=6).

Mother's body weight and food intake

Body weight and food intake were measured throughout gestation and lactation using a Marte balance (AS-1000) with an accuracy of 0.01 g. Body weight gain was determined as previously described (FALCAO-TEBAS, BENTO-SANTOS *et al.*, 2011) and the relative food intake was calculate according to the formula: Relative food intake (mg/g) = food intake (mg) / body weight (g).

Offspring body weight and body length

The body weight of pups was weekly recorded throughout the experiment with a Marte Scale, AS-1000, approaching 0.01 g. The body lengths of pups were recorded on days 21 to 90 of life by measuring the external surfaces (nose-to-anus length) using a digital caliper with an accuracy of 0.01 mm. These parameters were then used to determine the body mass index (BMI, grams/lengh²) (PIRES-DE-MELO, WANDERLEY DOS REIS *et al.*, 2009).

Hormonal and biochemical parameters

Serum from trunk blood was assayed for insulin and leptin using assay kits from Enzo Life Science (Sao Paulo, Brazil) and Millipore (Sao Paulo, Brazil), respectively. Triglycerides, glucose, cholesterol and total protein were analyzed by kits from LabTest (Minas Gerais, Brazil). All samples were analyzed in duplicate.

Incubation procedure to adrenergic stimulation in skeletal muscle

The soleus and EDL muscles were rapidly dissected and weighed, maintained at approximately resting length and incubated at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 5mM glucose and 10 mM ascorbic acid to prevent drug oxidation (NAVEGANTES, RESANO *et al.*, 2004). The pH of the buffer was equilibrated at 7.4

with 95% O₂ and 5% CO₂. Tissues were pre-incubated for 1h in the buffer, followed by incubation for 2h in a fresh medium of identical composition containing 10⁻⁵ M of an α - (phenylephrine) or a β - (isoprenaline), adrenergic agonists or 10mM of ascorbic acid alone (NAVEGANTES, RESANO *et al.*, 1999).

Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA 95060 USA), and Sovereign (Sao Paulo, Brazil). Isoprenaline hydrochloride, phenylephrine and ascorbic acid were dissolved in distilled water and stored at -20°C.

Enzymatic assays

Muscles were homogenized in extraction buffer (100mM-tris base, 10mM-EDTA, 2mM-PMSF, 10mM sodium orthovanadate) using a sampling homogenizer (Tecnal, Sao Paulo, Brazil). The enzymatic activities of citrate synthase (CS), phosphofructokinase (PFK) and β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase (β -HAD) determined by spectrophotometry as previously described (OPIE e NEWSHOLME, 1967; ARDAWI e NEWSHOLME, 1982; HEILBRONN, GAN *et al.*, 2007). Enzyme activities are reported as micromoles per minute per microgram of protein concentrations that was determined by the method of Bradford (1976).

Statistical Analyses

To avoid the “*effect of litter*” (HOLSON e PEARCE, 1992), each experimental group was constituted of animals from different litters. That is, there were no brothers into the groups. Statistical differences between the groups and intra the groups were

determined by Student's *t* test and one-way repeated measures ANOVA respectively followed by Tukey's post hoc test when appropriate. Pearson's correlation coefficient was used to correlate the number of pups that were born and the mother's body weight gain during gestation. Data are presented as means $\pm$ SEM and significance was set at $P < 0.05$. Data analysis was performed using the statistical program GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

During gestation, there was no difference between groups in terms of body weight, gain of body weight, food intake, and relative food intake (Table 1). During lactation, LP dams showed a lower body weight and absolute food intake than control (Table 1). The number of pups born per mother were similar in both groups [C = 11.0 (11–13) and LP = 10.0 (7–11); values expressed as median (minimal and maximal) [$p > 0.05$]. Pearson's correlation test between number of pups and body weight gain was not significant (C, $r^2 = 0.3517$, $p = 0.4070$; e LP, $r^2 = 0.0105$; $p = 0.8466$). Litter's weight from LP mothers was lower than control (C = 69.35 ± 3.01 ; LP = 53.24 ± 3.36 ; $p = 0.006$).

At weaning to 90 d old, LPp animals showed a lower body weight and BMI when compared to control (Fig 1A and 1C). LPp animals also showed a reduced body length until 70 d old (Fig 1B) and a higher gain of body weight than control (Fig 1D).

At 100 d old, LPp animals showed a reduction in body weight, absolute weight visceral fat tissue, heart, adrenal and soleus muscle when compared to control (Table 2). There is no difference in terms of relative weight of organs (Table 2). Serum glucose, triglycerides, cholesterol, leptin and insulin did not alter in animals submitted to a

perinatal low-protein diet (Table 3). LPp animals showed a reduction in total protein (LPp = 6.625 ± 0.105 ; Cp = 6.958 ± 0.095 ; mg/dL, $p < 0.05$) (Table 3).

In soleus muscle, both CS and PFK activity were not different when compared inter-group and intra-group (Fig 2A and 2B). However, LPp animals showed a decrease in the β -HAD activity in all groups especially when stimulated with α and β adrenergic drugs (LPp, LPp + α e LPp + β) when compared with their respective controls (Cp, Cp + α e Cp + β) (Fig 2C). Intra-group analysis showed a tendency of the treatment with α -adrenergic drugs to be higher than control (Cp + α = 197.02 ± 18.94 ; Cp = 117.98 ± 34.89 ; $p = 0.07$) (Fig 2C).

In EDL muscle, LPp animals showed a higher CS and PFK activity when compared to Cp (Fig 3A and 3B). For Cp animals, there was no difference in the β -HAD activity. However, when muscles were submitted to the treatment with drugs, there was no difference in the CS and PFK activity, but there was a reduction of β -HAD activity in LPp + α (Fig 3C). In intra-group analysis, control group showed a higher CS activity in response to the stimulation with both adrenergic drugs α and β when compared to Cp. For LPp animals, intra-group analysis showed a reduction in PFK activity when stimulated to β -adrenergic drug when compared to both LPp and LPp + α (Fig 3B). For intra-group analysis, the treatment with adrenergic drugs did not alter the β -HAD activity in the Cp animals (Fig 3C). However, intra-group analysis into LPp groups showed an increasing in the β -HAD activity when stimulated to β -adrenergic drug when compared to both LPp and LPp + α (Fig 3C).

DISCUSSION

In this study, we looked at the later effects of a perinatal low-protein diet on the metabolism of isolated skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation. In addition,

we evaluated the growth parameters, relative and absolute organs weight, serum leptin and insulin, and biochemical parameters in 90 d offspring. In the present study, patterns of response in terms of body weight gain and food intake by undernourished mothers were similar to those of the previous studies (ZAMENHOF, 1981; PINE, JESSOP *et al.*, 1994; MOITA, LUSTOSA *et al.*, 2011). Maternal weight gain is the standard measure used to assess pregnancy outcome, and it also allows examination of the extent to which an undernourished dam is able to change body composition to maintain lactational performance (PINE, JESSOP *et al.*, 1994).

During lactation, undernourished mothers showed a reduced food intake that was related to growth-restricted during development. In fact, our results showed that low-protein diet induced low birth weight and growth-restricted until adult age. Perinatal maternal protein restriction is associated to a lower store of mother's nutrients, and subsequently, less transfer of nutrients to the offspring which is related with reduced postnatal growth (LISBOA, PASSOS *et al.*, 2006). However, we observed that these animals presented a higher body weight gain than control. These results are in accordance with previous studies using the same experimental model (OZANNE e HALES, 2004; OZANNE, JENSEN *et al.*, 2005; LEANDRO, DA SILVA RIBEIRO *et al.*, 2011). Tissues that were previously exposed to low concentration of insulin and insulin-like growth factor (IGF-1) during fetal life develop abnormal secretion of this hormones in early post-natal life that can be associated to excessive gain of body weight (BRUCE e HANSON, 2010). In addition, It has been suggested that malnutrition during lactation may program growth hormone mRNA expression patterns in adulthood and that these changes could be responsible for differences in growth patterns (DE MOURA, LISBOA *et al.*, 2007).

The slowing of growth in the critical period of development may lead to disproportion in organ size since organs and tissues are growing rapidly (CHEN, MARTIN-GRONERT *et al.*, 2009). In the present study, animals from undernourished mother showed a reduction in absolute, but not relative, weight of heart, adrenal glands, visceral adipose tissue and *soleus* muscle. Previous studies have found that proportional organs weight/body weight in adult mice submitted to a maternal low-protein diet (8% casein) may be a protective mechanism to aid survival to reproductive age (DESAI, CROWTHER *et al.*, 1996; CHEN, MARTIN-GRONERT *et al.*, 2009). In conditions of protein intrauterine deprivation, there is the capacity to lose structural units such as nephrons, cardiomyocytes, or pancreatic β -cells within developing organ systems (BRUCE e HANSON, 2010). Such decreases in structural and probable functional capacity of an organ system may be consequence of a decrease in energy and oxygen supply across the placenta or a choice to maintain the selective development of the brain (GLUCKMAN, HANSON *et al.*, 2009).

In the present study, offspring from undernourished mother did not show difference in the fasting serum triglycerides, glucose, cholesterol, leptin and insulin. According to previous studies, there is an age-dependent effect on biochemical parameter such as fasting glycemia, cholesterolemia and triglyceridemia. It is interesting to observe that in young adult life, these offspring have a significantly better glucose tolerance than controls, and glucose intolerance associated with insulin resistance have been seen in offspring at 15 months of age (OZANNE, OLSEN *et al.*, 2003). Our previous study have shown that at 8 months, pups from mothers submitted to a low-protein diet during gestation and exhibited enhanced abdominal fat and increased levels of triglycerides and fatty acids in serum (OROZCO-SOLIS, LOPES DE SOUZA *et al.*, 2009). In addition, Zambrano *et. al.* (2006) have found no difference in serum leptin,

triglycerides and cholesterol in 110 d old offspring submitted to a perinatal low-protein diet (10% casein) (ZAMBRANO, BAUTISTA *et al.*, 2006).

The present study has identified that low-protein diet is associated with long-lasting effects on the metabolism of both EDL and soleus isolated skeletal muscle. In soleus muscle, perinatal low-protein diet did not alter the activity of PFK and CS enzymes, but reduced the activity of β -HAD. This result may be an indicative that via glycolytic was not affected while the oxidation of fatty acids was decreased. In the opposite, in the EDL muscle, perinatal low-protein diet did not alter the activity of β -HAD enzyme, while there was an increase in the activity of PFK and CS enzymes. This is an indicative of the preference for complete oxidation of glucose in this muscle (MUHLHAUSLER, DUFFIELD *et al.*, 2009). Soleus is a typical fatty acid metabolizing muscle and a decrease in the rate of fatty acid oxidation would be expected to have a major impact on insulin resistance. In fact, reduced oxidized fatty acids in the β -oxidation can echo on its accumulation inside the skeletal muscle and this is associated with the onset of insulin resistance (SILVEIRA, FIAMONCINI *et al.*, 2008). The mechanism behind fatty acid-induced down-regulation of glucose oxidation in skeletal muscle during contraction appears to involve different sites of regulation including glucose transport (Glut-4), glucose phosphorylation (hexokinase), glycogenolysis (glycogen phosphorylase), glycolytic flux (phosphofructokinase), acetyl-CoA/CoA ratio (pyruvate dehydrogenase) and mitochondrial ATP/ADP ratio (PETERSEN, DUFOUR *et al.*, 2004; SILVEIRA, FIAMONCINI *et al.*, 2008). Thus, perinatal low-protein diet-induced changes in the metabolism of glucose and fatty acid is type-muscle dependent, with more pronounced changes being seen in the oxidative type.

It is well known that of α and β adrenergic receptors promote an increase in the oxidation of glucose and fatty acids in skeletal muscle (ABU-ELHEIGA, OH *et al.*, 2003; CHA, RODGERS *et al.*, 2006). Herein, the effects of a perinatal low-protein diet are described in two different types of skeletal muscle submitted to adrenergic stimulation. We used isoprenaline which is a β_1 - and β_2 -adrenoreceptor agonist and phenylephrine which is a selective α_1 -adrenergic receptor agonist (NAVEGANTES, BAVIERA *et al.*, 2009). β_2 -adrenoreceptor is considered the most important receptor subtype involved in the muscle's lactate production metabolic intermediate that represents a significant fuel source and gluconeogenic precursor (QVISTH, HAGSTROM-TOFT *et al.*, 2008). Previous studies have shown that β_2 -adrenergic agonists induce hypertrophy of skeletal muscle, reduces muscle wasting in different catabolic situations including tumors, hyperthyroidism, and diabetes (NAVEGANTES, BAVIERA *et al.*, 2009). α_1 -adrenoreceptor subtype was observed in the gluteus maximus muscle of C57BL/6 mice (MOORE, JACKSON *et al.*, 2010), and recent findings have shown that subtle activation of α -adrenoreceptor can blunt arteriolar dilatation to brief tetanic contractions and restrict muscle blood flow at rest as well as during exercise (MOORE, BEARDEN *et al.*, 2010).

The treatment with α -adrenergic agonist in the soleus, muscle from control animals resulted in a tendency to increase the activity of β -HAD ($C_p + \alpha = 197.02 \pm 18.94$; $C_p = 117.98 \pm 34.89$; $p = 0.07$), but did not alter in the EDL muscle. The treatment with α and β agonists resulted increased activity of CS in EDL muscle. These results are in accordance with previous study (CHEN, MARTIN-GRONERT *et al.*, 2009). When stimulated with β -agonist, EDL muscle from perinatal low-protein offspring showed a reduction in the activity of PFK with a concomitant increase of β -

HAD. Our results suggest that EDL muscle from undernourished animal is more sensible to β -adrenergic stimulation to oxidize fatty acid.

The activity of β -HAD in the soleus muscle from offspring of low protein-fed rat dams remained reduced when stimulate with both α and β agonists. Our results indicate that there is a probable adrenergic hyporesposiveness in both type of skeletal muscle in consequence of a perinatal low-protein diet. Similar result has been published in adipose tissue. Previous study has shown that male offspring of low protein-fed rat dams demonstrate reduced epinephrine and norepinephrine concentrations, α_{2A} -adrenoreceptor levels in adipocytes isolated from epididymal, subcutaneous, and intra-abdominal fat stores, and a higher β_1 - and β_3 -adrenoreceptors than controls, after an overnight fast (PETRY, OZANNE *et al.*, 2000). Under certain circumstances the symphatic nervous system promotes glucose uptake into peripheral tissues and this effects are seen by administration of adrenergic agonists. Consequently, when undernourished animals live in an environment which activate sympathetic pathways leading to enhanced glucose uptake, these pathways remain robust into adult life, facilitating deposition of ingested energy in skeletal muscle and adipose tissue and contributing to expansion of body fat . If this responses are adaptive or predictive is not clear, although it they can result in the programming of metabolic disease later in life (GLUCKMAN, HANSON *et al.*, 2009).This suggestion is based on the original thrifty phenotype hypothesis which stated that fetal adaptations to a poor intrauterine environment may have adverse consequences if there is a relative excess of nutrition available in adult life (BARKER, 2007).

CONCLUSION

Perinatal low-protein diet-induced changes in isolated skeletal muscle are dependent of muscle type. In oxidative muscle, we have shown an indicative that via glycolytic was not affected while the oxidation of fatty acids was decreased. In glycolytic muscle, perinatal low-protein diet increased via glycolytic and did not alter the fatty acid oxidation. This is an indicative of the preference for complete oxidation of glucose in this muscle. Under adrenergic stimulation, isolated soleus muscle from perinatal undernourished offspring remained reduced when stimulate with both α and β agonists. However, EDL muscle from undernourished animal is more sensible to β -adrenergic stimulation to oxidize fatty acid.

Acknowledgements

The authors are indebted to Lucia Pires for technical assistance, and to Edeones França. Special thanks to Dr Almir Gonçalves Wanderley by the availability of the space and bathing equipment isolated. This research was supported by the Foundation to Support Science and Research in Pernambuco State—Brazil (FACEPE) and the National Council for Research—Brazil (CNPq).

REFERENCES

- ABU-ELHEIGA, L. *et al.* Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.l.], v. 100, n. 18, p. 10207-12, Sep 2 2003.
- ARDAWI, M. S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochem J* [S.l.], v. 208, n. 3, p. 743-8, Dec 15 1982.

BARKER, D.; SAITO, M. Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* [S.I.], v. 212, n. 1188, p. 317-32, Jul 14 1981.

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

BARRETO-MEDEIROS, J. M. *et al.* Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 49-52, Feb 2004.

BRUCE, K. D.; HANSON, M. A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr* [S.I.], v. 140, n. 3, p. 648-52, Mar 2010.

CHA, S. H. *et al.* Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 103, n. 42, p. 15410-5, Oct 17 2006.

CHEN, J. H. *et al.* Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. *PLoS One* [S.I.], v. 4, n. 3, p. e4950, 2009.

DE MOURA, E. G. *et al.* Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 134-9, Feb 2007.

DESAI, M. *et al.* Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* [S.I.], v. 76, n. 4, p. 591-603, Oct 1996.

FALCAO-TEBAS, F. *et al.* Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr* [S.I.], p. 1-6, Jul 4 2011.

FERNANDEZ-TWINN, D. S. *et al.* Maternal low-protein diet programs cardiac beta-adrenergic response and signaling in 3-mo-old male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [S.I.], v. 291, n. 2, p. R429-36, Aug 2006.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet* [S.I.], v. 373, n. 9675, p. 1654-7, May 9 2009.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 130-41, Jul 2005.

HANSON, M. *et al.* Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* [S.I.], v. 106, n. 1, p. 272-80, Jul 2011.

HEILBRONN, L. K. *et al.* Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J Clin Endocrinol Metab* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 1467-73, Apr 2007.

HOLSON, R. R.; PEARCE, B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Teratol* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 221-8, May-Jun 1992.

LEANDRO, C. G. *et al.* Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *Eur J Nutr* [S.I.], Oct 29 2011.

LISBOA, P. C. *et al.* Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm Metab Res* [S.I.], v. 38, n. 5, p. 295-9, May 2006.

LOPES DE SOUZA, S. *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 1400-8, Mar 2008.

MOITA, L. *et al.* Moderate Physical Training Attenuates the Effects of Perinatal Undernutrition on the Morphometry of the Splenic Lymphoid Follicles in Endotoxemic Adult Rats. *Neuroimmunomodulation* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 103-110, Oct 27 2011.

MOORE, A. W. *et al.* Regional activation of rapid onset vasodilatation in mouse skeletal muscle: regulation through alpha-adrenoreceptors. *J Physiol* [S.I.], v. 588, n. Pt 17, p. 3321-31, Sep 1 2010.

MOORE, A. W. *et al.* Regional heterogeneity of alpha-adrenoreceptor subtypes in arteriolar networks of mouse skeletal muscle. *J Physiol* [S.I.], v. 588, n. Pt 21, p. 4261-74, Nov 1 2010.

MUHLHAUSLER, B. S. *et al.* The transition from fetal growth restriction to accelerated postnatal growth: a potential role for insulin signalling in skeletal muscle. *J Physiol* [S.I.], v. 587, n. Pt 17, p. 4199-211, Sep 1 2009.

NAVEGANTES, L. C. *et al.* The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 42, n. 1, p. 21-8, Jan 2009.

NAVEGANTES, L. C. *et al.* Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 286, n. 4, p. E642-7, Apr 2004.

NAVEGANTES, L. C. *et al.* Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 277, n. 5 Pt 1, p. E883-9, Nov 1999.

OPIE, L. H.; NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem J* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 391-9, May 1967.

OROZCO-SOLIS, R. *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* [S.I.], v. 96, n. 3, p. 481-92, Mar 2 2009.

OZANNE, S. E. *et al.* Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 280, n. 3, p. E534-9, Mar 2001.

OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* [S.I.], v. 427, n. 6973, p. 411-2, Jan 29 2004.

OZANNE, S. E. *et al.* Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 547-52, Mar 2005.

OZANNE, S. E. *et al.* Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* [S.I.], v. 177, n. 2, p. 235-41, May 2003.

PETERSEN, K. F. *et al.* Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* [S.I.], v. 350, n. 7, p. 664-71, Feb 12 2004.

PETRY, C. J. *et al.* Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. *Horm Metab Res* [S.I.], v. 32, n. 6, p. 233-9, Jun 2000.

PINE, A. P. *et al.* Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 4. Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein. *Br J Nutr* [S.I.], v. 72, n. 6, p. 831-44, Dec 1994.

PIRES-DE-MELO, I. H. *et al.* Short- and long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the morphology of the larynx. *Nutrition* [S.I.], v. 25, n. 7-8, p. 855-60, Jul-Aug 2009.

QVISTH, V. *et al.* Catecholamine regulation of local lactate production in vivo in skeletal muscle and adipose tissue: role of α -adrenoreceptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* [S.I.], v. 93, n. 1, p. 240-6, Jan 2008.

REEVES, P. G. *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* [S.I.], v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

SILVEIRA, L. R. *et al.* Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol* [S.I.], v. 217, n. 1, p. 1-12, Oct 2008.

TOSTE, F. P. *et al.* Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr* [S.I.], v. 95, n. 4, p. 830-7, Apr 2006.

YOUNG, J. B. Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. *Int J Obes (Lond)* [S.I.], v. 30 Suppl 4, p. S41-9, Dec 2006.

ZAMBRANO, E. *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* [S.I.], v. 571, n. Pt 1, p. 221-30, Feb 15 2006.

ZAMENHOF, S. Maternal nutrient storage and efficiency in production of fetal brain tissue in rats. *Biol Neonate* [S.I.], v. 39, n. 1-2, p. 45-51, 1981.

Table 1: Gain of body weight and food intake during gestation and lactation of mother's that were submitted to either a control (C) or a low-protein diet (LP) during perinatal period.

	Groups											
	Control (C, n=6)						Low Protein (LP, n=6)					
	Week 1 (day 7)		Week 2 (day 14)		Week 3 (day 19)		Week 1 (day 7)		Week 2 (day 14)		Week 3 (day 21)	
	Mean	SE M	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SE M	Mean	SE M
Gestation												
Body Weight (g)	256.17	± 6.14	282.02	± 5.88	345.11	± 8.27	257.90	± 3.71	281.3	± 5.69	329.63	± 7.80
% Gain of Body Weight	9.06	± 2.0	19.27	± 2.26	42.48	± 1.93	10.33	± 0.86	20.38	± 2.10	41.0	± 2.71
Food Intake (g/day)	17.23	± 1.61	18.91	± 0.75	16.61	± 0.89	20.09	± 0.88	17.86	± 1.04	16.66	± 1.61
Relative Food Intake (mg/g of body weight)	66.46	± 5.6	67.11	± 2.66	48.03	± 1.96	77.89	± 3.13	63.43	± 3.23	50.76	± 6.15
Lactation												
Body Weight (g)	273.21	± 9.27	275.73	± 8.42	280.4	± 9.34	250.79	± 5.34	232.3	± 8.57*	214.62	± 12.4*
% Loss of Body Weight	5.17	± 3.93	4.18	± 4.23	4.06	± 5.43	6.51	± 1.54	13.83	± 3.47	18.40	± 4.35
Food Intake (g/day)	22.06	± 2.34	33.99	± 2.46	38.53	± 7.15	17.71	± 1.36	21.67	± 1.77*	25.76	± 1.85*
Relative Food Intake (mg/g of body weight)	80.41	± 7.84	117.89	± 7.16	139.9	± 28.56	69.15	± 5.73	99.92	± 4.57	116.02	± 5.32

*P<0.05 versus Cp. using Student's t test. The values are presented as mean ± SEM

Table 2: Effects of maternal protein restriction on organ weights of offspring at 100 days of age#.

	Experimental Groups					
	Cp (n=12)			LPp (n=12)		
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
Body Weight (g)	349.7	±	7.438	287.5	±	9.735*
Visceral Fat (g)	9.018	±	0.517	6.339	±	0.675*
Relative Weight Visceral Fat [(fat weight/body weight)x100]	2.575	±	0.135	2.168	±	0.185
Heart (g)	1.309	±	0.038	1.090	±	0.035*
Relative Weight of Heart [(heart weight/body weight)x100]	0.375	±	0.008	0.380	±	0.007
Right Adrenal (g)	0.036	±	0.003	0.029	±	0.001*
Relative Weight of Adrenal [(adrenal weight/body weight)x100]	0.010	±	0.001	0.010	±	0.001
Right Soleus Muscle (g)	0.190	±	0.004	0.160	±	0.005*
Relative Weight of Soleus Muscle [(soleus weight/body weight)x100]	0.054	±	0.001	0.055	±	0.001
Right EDL Muscle (g)	0.288	±	0.119	0.144	±	0.005
Relative Weight of EDL Muscle [(EDL weight/body weight)x100]	0.084	±	0.036	0.05	±	0.001

Cp, pups of mother's submitted at control diet throughout gestation and lactation;

LPp, pups of mother's submitted at Low Protein diet throughout gestation and lactation;

The organs and tissues were dissected and weighed immediately after the decapitation of the animals.

* P<0.05 using Student's t test. The values are presented as mean ± SEM.

Table 3: Effects of maternal protein restriction on biochemical and hormonal serum parameters of offspring at 100 days of age.

	Experimental Groups					
	Cp (n=6)			LPp (n=6)		
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
Total Protein (mg/dL)	6.958	±	0.095	6.625	±	0.105*
Glucose (mg/dL)	99.82	±	2.823	116.05	±	7.467
Triglycerides (mg/dL)	35.667	±	2.709	42.222	±	3.593
Cholesterol (mg/dL)	66.500	±	3.352	66.251	±	2.302
Leptin (ng/mL)	0.906	±	0.078	0.818	±	0.081
Insulin (ng/mL)	0.551	±	0.103	0.543	±	0.126

Cp, pups of mother's submitted at control diet throughout gestation and lactation;

LPp, pups of mother's submitted at Low Protein diet throughout gestation and lactation;

* P<0.05 using Student's t test. The values are presented as mean ± SEM.

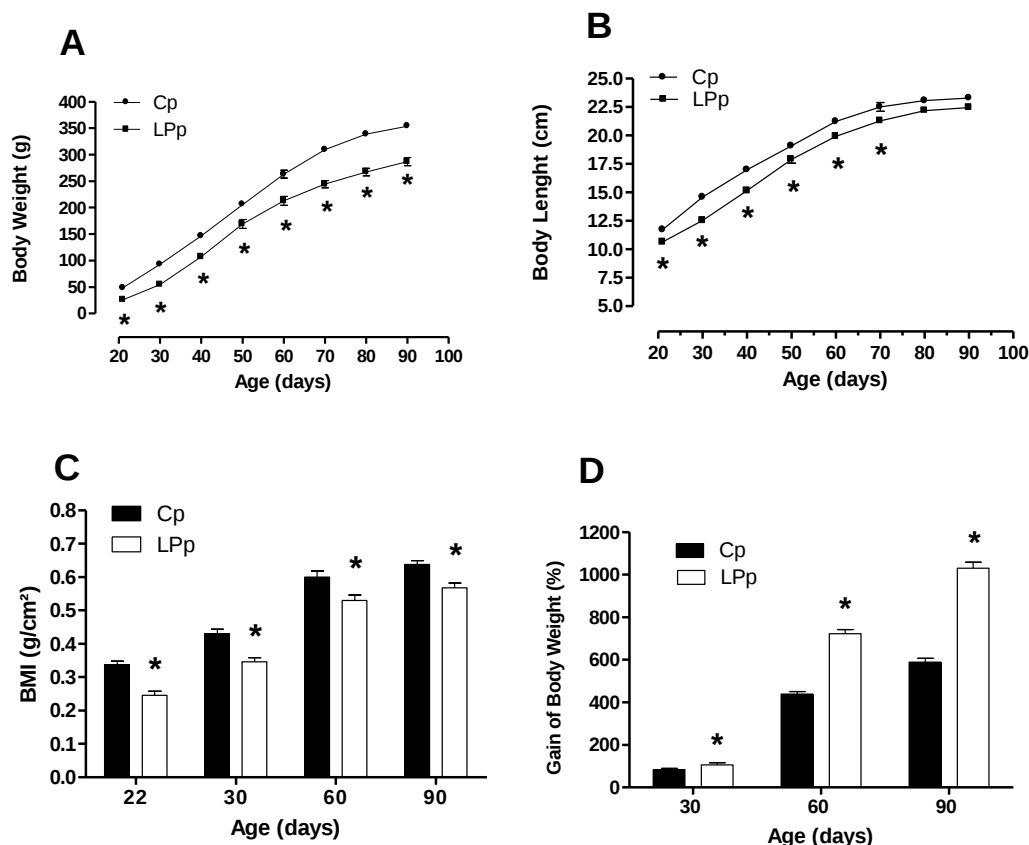


Fig. 1. Body Weight (A), Body Length (B), BMI (C) and the Gain of Body Weight (D) in the offspring. Control (Cp, n=18) and low-protein diet (LPp, n=18). Measurements were taken every ten days from weaning to 90 days old. Data are presented as means ± S.E.M. * P<0.05 versus Cp. using Student's t test.

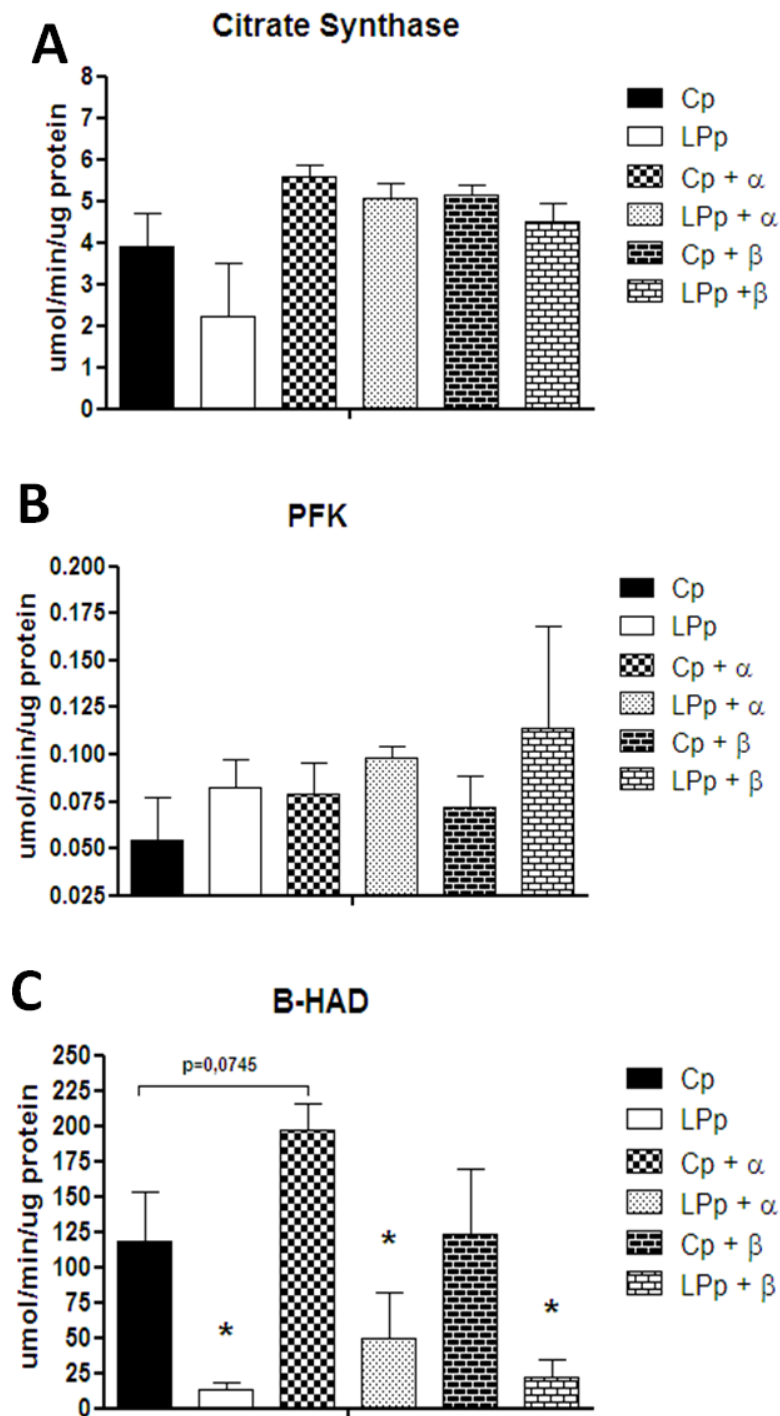


Fig. 2. Effects of maternal protein restriction on activities of enzymes citrate synthase (A), PFK (B), β -HAD (C) in the isolated soleus muscle subjected to adrenergic stimulation. Control pups (Cp, $n=6$); control pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (Cp+ α , $n=6$); control pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (Cp+ β , $n=6$); low-protein diet pups (LPp, $n=6$); low-protein diet pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (LPp+ α , $n=6$) and low-protein diet pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (LPp+ β , $n=6$). Data are presented as means + S.E.M. * $P < 0.05$ versus yours respective control (Cp, Cp + α , or Cp + β) using Student's t test.

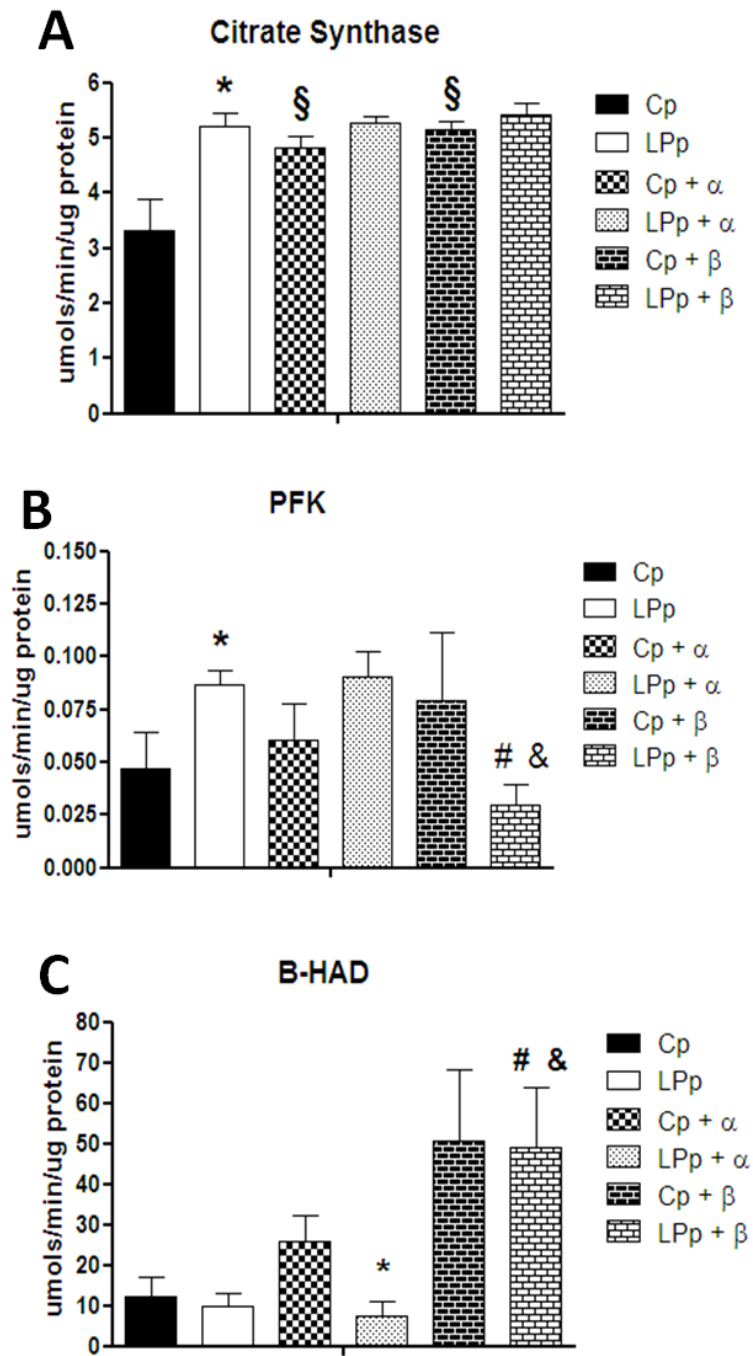


Fig. 3. Effects of maternal protein restriction on activities of enzymes citrate synthase (A), PFK (B), β -HAD (C) in the isolated EDL muscle subjected to adrenergic stimulation. Control pups (Cp, $n=6$); control pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (Cp+ α , $n=6$); control pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (Cp+ β , $n=6$); low-protein diet pups (LPp, $n=6$); low-protein diet pups submitted to phenylephrine 10^{-5} M (LPp+ α , $n=6$) and low-protein diet pups submitted to isoprenaline 10^{-5} M (LPp+ β , $n=6$). Data are presented as means + S.E.M. * $P<0.05$ versus yours respective control (Cp, Cp + α , or Cp + β) using Student's t test. § $P<0.05$ versus Cp. # $P<0.05$ versus LPp. & $P<0.05$ versus LPp + α , by using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resposta a estímulos ou insultos ambientais, a plasticidade fenotípica possibilita a ocorrência de mudanças estruturais e metabólicas no indivíduo. A desnutrição protéica perinatal induz mudanças que tem repercussões em curto e longo prazo (adaptativa imediata ou preditiva, respectivamente). Entre as respostas adaptativas imediatas foram observados menor peso ao nascer (indicativo de retardo do crescimento fetal) e o crescimento pós-natal acelerado (*catch up*) em ratos provindos de mães desnutridas na gestação e lactação. Como respostas preditivas, à desnutrição protéica perinatal parece programar o metabolismo energético no músculo predominantemente oxidativo, diminuindo a beta oxidação de ácidos graxos além de, causar uma hiporesponsividade aos sinais adrenérgicos, responsáveis pelo aumento da oxidação de ácidos graxos. Enquanto que, no músculo predominantemente glicolítico, parece aumentar a oxidação de carboidratos e a responsividade dos receptores β -adrenérgicos ao sinal que induz o aumento do metabolismo dos ácidos graxos e inibe o metabolismo glicolítico. Desta forma, a programação do controle do metabolismo energético muscular através da comunicação hipotálamo-músculo, via SNS, pode favorecer o desenvolvimento de obesidade e co-morbididades associadas com a desnutrição no início da vida.

PERSPECTIVAS

Com este mesmo modelo experimental:

- Expandir as avaliações para o hipotálamo, que é o centro regulado do metabolismo energético periférico;
- Ampliar as avaliações no músculo, para analisar a expressão de proteínas como UCP-3 e dos receptores α e β adrenérgicos;
- Colocar os ratos provindos de mães submetidas à desnutrição protéica perinatal em gaiolas de atividade física voluntária coletiva, do desmame até a idade adulta, para testar o provável efeito re-programado da atividade física no metabolismo energético muscular.

REFERÊNCIAS

ARDAWI, M. S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochem J* [S.I.], v. 208, n. 3, p. 743-8, Dec 15 1982.

BAUTISTA, A. *et al.* Development of behavior in the litter huddle in rat pups: within- and between-litter differences. *Dev Psychobiol* [S.I.], v. 52, n. 1, p. 35-43, Jan.

HASEMAN, J. K.; HOGAN, M. D. Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 165-71, Oct 1975.

HEILBRONN, L. K. *et al.* Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J Clin Endocrinol Metab* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 1467-73, Apr 2007.

HOLSON, R. R.; PEARCE, B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Teratol* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 221-8, May-Jun 1992.

MARCONDES, F. K. *et al.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* [S.I.], v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov 2002.

NAVEGANTES, L. C. *et al.* Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 286, n. 4, p. E642-7, Apr 2004.

NAVEGANTES, L. C. *et al.* Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 277, n. 5 Pt 1, p. E883-9, Nov 1999.

OPIE, L. H.; NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem J* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 391-9, May 1967.

REEVES, P. G. *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* [S.I.], v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

TOSTE, F. P. *et al.* Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr* [S.I.], v. 95, n. 4, p. 830-7, Apr 2006.

ZAMBRANO, E. *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* [S.I.], v. 571, n. Pt 1, p. 221-30, Feb 15 2006.

ZORRILLA, E. P. Multiparous species present problems (and possibilities) to developmentalists. *Dev Psychobiol* [S.I.], v. 30, n. 2, p. 141-50, Mar 1997.

ANEXOS

Anexo A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição perinatal: efeitos sobre o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético” ao periódico Revista de Nutrição.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 21 de fevereiro de 2011.

Ofício nº 356/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhaes de Castro**,
Departamento de Nutrição - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.049076/2010-35

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **"EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO MÚSCULOS ESQUELÉTICOS EM RATOS NA IDADE ADULTA."**

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição. Número de animais previsto no protocolo: 48 ratos Wistar machos adultos ; idade de 90 e 120 dias.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen

ANEXO B – Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição perinatal: efeitos sobre o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo energético no músculo esquelético” ao conselho editorial do periódico Revista de Nutrição.



PUC
CAMPINAS
pontificia universidade católica

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI

REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAS ABSTRACT - EMBASE
PSTA - POPLINE - POP LINE - NISC - SCOPUS - WEB SCIENCE
BASES NACIONAIS: LILACS - SOELO - PERI -
QUALIS (CAPES) B4-NACIONAL
ISSN 1415-6273

Campinas, 15 de julho de 2011

CA/NE/RN nº 944/2011

Prezado Prof. Dr. Adriano Bento-Santos

Venho pelo presente agradecer o envio do manuscrito "Plasticidade fenotípica induzida por desnutrição..." para publicação na Revista de Nutrição. Para toda a correspondência futura relativa a este trabalho, por favor, refira-se ao protocolo número 2461.

O Conselho Editorial procederá à tramitação regular do processo de avaliação do manuscrito, entendendo que o mesmo não foi publicado anteriormente e que não será submetido a outro periódico durante o período de revisão.

Tão logo quanto possível, V.Sa será notificado(a) a respeito do processo para consideração de eventuais sugestões dos revisores ou sobre a aprovação ou rejeição do trabalho.

APROVEITAMOS PARA INFORMÁ-LO(A) QUE CASO O ARTIGO SEJA CONSIDERADO COM MÉRITO PARA PUBLICAÇÃO, SERÁ ACEITO SOMENTE APENAS MAIS UMA RESUBMISSÃO DO MESMO POR V.SA (APÓS O PROCESSO DE REVISÃO POR PARES).

Novamente grata por seu interesse na Revista de Nutrição, expresso nossas saudações.

Atenciosamente

Profa. Dra. Vânia Aparecida Leandro Merhi
Editora Científica
Revista de Nutrição

Profa. Dra. Silvana Mariana Srebemich
Editora Adjunta
Revista de Nutrição