



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE BRASILEIRA
NÚCLEO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO HUMANA E ANIMAL
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

Vinícius Moreira Gonçalves Costa

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE RATAS SUPERALIMENTADAS NA INFÂNCIA
EXPOSTAS A DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO**

Juiz de Fora - MG, 2018

Vinícius Moreira Gonçalves Costa

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE RATAS SUPERALIMENTADAS NA INFÂNCIA
EXPOSTAS A DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Peters

Juiz de Fora - MG, 2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Vinícius Moreira Gonçalves.

Avaliação reprodutiva de ratas superalimentadas na infância expostas a diferentes tipos de treinamento físico / Vinícius Moreira Gonçalves Costa. -- 2018.

94 p. : il.

Orientadora: Vera Maria Peters

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. Infertilidade feminina. 2. Reprodução animal. 3. Obesidade. 4. Treinamento físico. 5. Ratas Wistar. I. Peters, Vera Maria , orient. II. Título.

Vinicius Moreira Gonçalves Costa

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE RATAS SUPERALIMENTADAS NA INFÂNCIA
EXPOSTAS A DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde - Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em 08/03/2018

BANCA EXAMINADORA



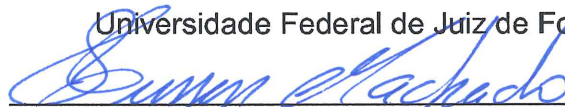
Dr^a. Vera Maria Peters

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr^a. Martha de Oliveira Guerra

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Hussien Machado

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Juiz de Fora - MG, 2018

Dedico este trabalho aos meus pais e à toda minha família, por todo amor, carinho, apoio e dedicação doados para que eu pudesse realizar os meus sonhos e ir em busca dos meus objetivos. Desta forma, pude evoluir como homem e profissional e ter perspectiva de um grande futuro em minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus, porque sem Ele e toda sua graça, nada em minha vida seria possível.

Segundo, aos meus pais, que me amaram incondicionalmente, me ensinaram os reais valores da vida e que não mediram esforços para que eu pudesse estudar, buscar meus objetivos e realizar meus sonhos.

À toda minha família, que sempre me apoiou e me deu amor, força e coragem para superar os obstáculos que encontrei em minha jornada.

Aos meus tios Fernando Peregrino, Imaculada da Conceição Moreira e Maria de Fátima Moreira, que me acolheram como filho e me deram assistência, suporte e auxílio nos momentos mais difíceis do meu caminho.

Às professoras Vera Peters e Martha Guerra, que me inseriram no universo da pesquisa científica, dando-me a oportunidade de estagiar no Centro de Biologia da Reprodução. Sendo pacientes, atenciosas e generosas com a minha pessoa, elas entenderam as diversas situações enfrentadas nesse longo caminho.

À Professora Ana Eliza Andreazzi do departamento de Fisiologia Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo auxílio nas análises dos dados, além do aconselhamento e incentivo. Adicionalmente, gostaria também de agradecer ao Prof. Hussen Machado e à Dr^a. Santuzza Arreguy por aceitarem fazer parte da minha banca, agregar valores, conhecimento e contribuições para enriquecer este trabalho.

À minha namorada Paula Palazzi pelo carinho, incentivo e auxílio nos momentos difíceis, ao ficar sempre ao meu lado e me dar força para a conclusão desse trabalho.

Ao meu Professor e amigo/irmão, que a pós-graduação me deu a honra de conhecer, futuro doutor Leonardo Toshio. Pela amizade, companheirismo, conselhos, paciência, noites em claro de estresses pré-apresentações, aulas de técnicas cirúrgicas, reuniões/bar científicas e todas as risadas compartilhadas nessa jornada.

Também o meu muito obrigado aos meus companheiros de pós-graduação, principalmente a Carlos Gabriel de Lade, Mariana Bolotari, Tamires Schaeffer e Marcella Terra, além das alunas de iniciação científica Carolina Ribeiro e Beatriz Macedo que estiveram comigo compartilhando as alegrias, tristezas, sofrimentos e angústias, e ajudaram nessa experiência científica enriquecedora e divertida. E a todos meus amigos, colegas de trabalho e também àqueles que de certa forma contribuíram para a realização desse projeto.

Em especial, gostaria de agradecer a todos os animais laboratório que cederam suas vidas em prol da ciência. Desempenhando um nobre papel sob a experimentação, na busca por conhecimento e melhor entendimento patológico, na prevenção e tratamento de diversas enfermidades.

E por último, mas não menos importante, agradeço às Redes Mineiras de Bioterismo (CVZ RED - 00009/14) e Toxicologia e Farmacologia (CBB RED - 00008/14) – da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas de Gerais – FAPEMIG - Minas Gerais - Brasil, pelo suporte financeiro fundamental para realização desse projeto.

.

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas
o que melhor se adapta às mudanças”.*

Charles Robert Darwin

RESUMO

Os dados estatísticos de prevalência e incidência de sobrepeso/obesidade vem aumentando ao longo dos anos e atinge milhões de pessoas ao redor do mundo, tornando-se assim, umas das grandes epidemias do século XXI. A globalização e o aumento na disponibilidade de alimentos mais palatáveis e ricos em gordura saturada, somados ao estilo de vida sedentário, contribuem diretamente no desenvolvimento dessa condição. Estudos demonstram que alterações nutricionais durante fases críticas do desenvolvimento infantil, como a lactação, estão associadas ao desenvolvimento de obesidade, alterações metabólicas, doenças cardiovasculares, problemas respiratórios e diabetes. Além disso, o sobrepeso/obesidade pode influenciar na função reprodutiva da população, gerando malformações fetais, infertilidade, assim como morte materna e fetal. Considerando o exercício físico como fator primário no combate ao sobrepeso/obesidade, pretendeu-se avaliar se o exercício físico, em diferentes intensidades, é capaz de influenciar na saúde reprodutiva de indivíduos com sobrepeso/obesos. Foram utilizadas 40 ratas Wistar provenientes de ninhadas padrão (NP=10 filhotes/mãe) e de ninhadas reduzidas (NR=4 filhotes/mãe) que promoveram o sobrepeso/obesidade. Os animais foram treinados durante oito semanas em protocolos de intensidade moderada (*Endurance*) e intervalar de alta intensidade (*Hiit*), acasalados aos 90 dias de vida e eutanasiados no 20º dia de gestação. As variáveis metabólicas, bioquímicas e reprodutivas foram coletadas e analisadas. Os animais dos grupos superalimentados treinados *Endurance* e *Hiit* apresentaram redução significativa das médias de peso, consumo, índice de tolerância à insulina e de determinados parâmetros bioquímicos e reprodutivos analisados quando comparados com o grupo superalimentado sedentário. Porém, não houve diferenças significativas com relação ao comprimento nasoanal; peso relativos de órgãos; gorduras retroperitoneal e perigonadal; além do teste de tolerância oral à glicose; índices de gestação, implantação e reabsorção fetal; e demais análises fetais nos grupos estudados. Concluiu-se que o treinamento físico, em suas diferentes intensidades, não foi capaz de melhorar significativamente a capacidade reprodutiva desses animais, entretanto, foi eficiente em promover redução do peso, consumo, sensibilidade à insulina e de determinados parâmetros bioquímicos de animais superalimentados durante a fase lactente. Além disso, o exercício *Endurance* se mostrou mais eficiente no controle das variáveis descritas acima, quando comparado ao exercício *Hiit*.

Palavras-chave: infertilidade feminina, reprodução animal, obesidade, ratas, redução de ninhada, treinamento físico.

ABSTRACT

Statistical data of incidence and prevalence of Overweight/obesity have been growing over the years and this condition affects millions of people around the world, making it one of the great epidemics of the 21th century. Globalization and the increase in the availability of more palatable foods rich in saturated fat, added to the sedentary lifestyle, contribute directly to the development of this condition. Studies show that nutritional changes during critical stages of childhood development, such as lactation, are associated with the development of obesity, metabolic disorders, cardiovascular diseases, respiratory problems and diabetes. In addition, overweight/obesity can influence the reproductive function of the population causing fetal malformations, infertility, as well as maternal and fetal death. Considering physical exercise as a primary factor against overweight / obesity, we intend to evaluate whether physical exercise, in different intensities, is capable of influencing the reproductive health of overweight/obese individuals. Forty Wistar rats from normal litters (NL = 10) and small litters (SL = 4) were used and overweight/obesity was induced by litter reduction. The animals were trained for 8 weeks in protocols (Endurance and Hiit), mated at 90 days of age and euthanized on the 20th day of gestation. Metabolic, biochemical and reproductive data were collected and analyzed. The animals of the overfeed groups trained Endurance and Hiit showed reduction with significant differences in body weight, consumption, insulin tolerance test and in some biochemical e reproductive parameters analyzed when compared to the control groups. However, there were no significant differences regarding nasoanal distance, relative organ weight, retroperitoneal and perigonadal fats, as well as oral glucose tolerance test, gestation index, implantation and fetal resorption in the studied groups. It was concluded that the physical training, in its different intensities, was not able to improve significantly the reproductive capacity of these animals, however, it was efficient to promote weight reduction, consumption, insulin sensitivity and certain biochemical parameters of supercharged animals during the phase. In addition, the Endurance exercise was more efficient in controlling the variables, described above, when compared to the Hiit exercise.

Key words: female infertility, animal reproduction, obesity, rats, litter reduction, physical training.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CBR	Centro de biologia da reprodução
CNA	Comprimento nasoanal
PN	Pós-nascimento
FC _{max}	Frequência cardíaca máxima
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HHG	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
NP	Ninhada padrão

NR	Ninhada reduzida
NPsed	Ninhada padrão sedentária
NRsed	Ninhada reduzida sedentária
NREnd	Ninhada reduzida submetida ao exercício de intensidade moderada ou <i>endurance</i>
NRhiit	Ninhada reduzida submetida ao exercício intervalar de alta intensidade ou high intensity interval training (Hiit)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SHBG	Globulina de ligação de esteroides sexuais
SOP	Síndrome do ovário policístico
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
T	Tempo
VO _{2max}	Volume de oxigênio máximo consumido durante o teste de aptidão física.

LISTA DE SÍMBOLOS

g	gramas
° C	graus Celsius
mg	miligramas
µm	microgramas
UI	unidade internacional de medida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 A Obesidade	16
2.2 Impactos da obesidade na saúde reprodutiva feminina	17
2.3 A epigenética e a programação metabólica na obesidade	19
2.4 A relação entre a atividade física e reprodução	19
2.5 Os modelos experimentais de obesidade em animais	21
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Geral	25
4.2. Específicos	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Animais	26
5.2. Formação dos subgrupos de ninhada reduzida (superalimentadas)	26
5.3. Estabelecimento do tamanho da ninhada por mãe.	27
5.4. Determinação do consumo máximo de oxigênio e protocolo de treinamento	27
5.5. Avaliação do peso corporal e consumo alimentar	29
5.6. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	29
5.7. Avaliação de tolerância à insulina (TTI)	29
5.8. Acasalamento dos animais	30
5.9. Eutanásia	30
5.10. Análises bioquímicas séricas	30
5.11. Dissecção, pesagem dos órgãos e análises fetais	31
5.12. Análises estatísticas	31
6. RESULTADOS	33
6.1. Artigo enviado a publicação	33

6.2. Artigo a ser submetido para publicação	35
6.3. Resumos apresentados em congressos	37
7. COMENTÁRIOS GERAIS	38
8. CONCLUSÃO	39
9. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade feminina e demais problemas reprodutivos têm aumentado de forma expressiva em todo o mundo. Essas desordens estão associadas diretamente a diversos fatores e, dentre eles, estão o sobrepeso e a obesidade que, somados ao atual estilo de vida da população, contribuem para a piora do quadro (WHO, 2014).

Um dos principais fatores está relacionado com a hiperleptinemia em mulheres obesas, gerado pelo acúmulo elevado de gordura corporal, que estimula os pulsos do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), de forma a alterar os padrões ovulatórios das fêmeas e acarretar distúrbios reprodutivos e infertilidade (YU et al., 1997). Como consequência disso, tem-se maior dificuldade de engravidar, desenvolvimento da síndrome do ovário policístico (SOP), aumento das taxas de abortos, predisposição às complicações obstétricas e incidência de malformações fetais (OLIVEIRA; LEMOS, 2010).

A complexidade da relação entre o sucesso reprodutivo e a obesidade feminina tem sido discutida, pois diversos fatores estão relacionados. Dentre eles, se destacam as alterações metabólicas e hormonais geradas na infância pelo acúmulo de gordura, que podem se estender para a vida adulta da mulher, e comprometer sua capacidade reprodutiva (OLIVEIRA; LEMOS, 2010). Estas alterações na infância provocadas pelo excesso de peso se devem às modificações nas “janelas de programação” de fetos, neonatos e jovens adultos por vias epigenéticas, que podem provocar complicações que se apresentam por toda a vida (HABBOUT et al., 2013; RINALDI et al., 2014). Estas “janelas” ocorrem em períodos críticos de desenvolvimento físico e neuromotor do indivíduo, e alteram o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Um exemplo disso, são as manipulações dietéticas fornecidas aos indivíduos durante as fases de plasticidades neuronais, tais como, o período gestacional e infantil que são capazes de alterar o funcionamento adequado das vias hipotalâmicas responsáveis pela regulação do consumo alimentar, e podem levar às alterações permanentes na manutenção do peso corporal e, conseqüentemente, gerar possíveis distúrbios metabólicos futuros (KOZAK et al., 2000; GROVE; SMITH, 2003).

O sobrepeso e a obesidade infantil têm se tornado um problema real para a saúde pública mundial, pois afeta milhões de crianças e adolescentes (WHO, 2014). Por este motivo, a Diretriz Brasileira de Diagnósticos e Tratamentos de Saúde, em 2005, recomendou mudanças nos hábitos alimentares e no estilo de vida com objetivo de prevenir e combater o sobrepeso e a obesidade, através de uma alimentação adequada e práticas

regulares de atividade física para melhorar a qualidade de vida da população e, além disso, a capacidade reprodutiva do indivíduo.

Os exercícios físicos, em suas diferentes intensidades, são um potente atenuador desta condição, por gerar gastos de energia, lipólise e o aumento de consumo de ácidos graxos periféricos e assim, reduzir os depósitos de gordura corporal, hiperglicemia e hiperleptinemia (NAKAMURA et al., 1998). Dessa forma, o exercício físico é capaz de atuar no controle desses parâmetros citados em mulheres obesas (TAN et al., 1982; HULVER; HOUMARD, 2003), que sugere assim, possível melhora na capacidade reprodutiva de fêmeas com sobrepeso/obesidade.

Portanto, com vistas a verificar esta influência, buscou-se neste trabalho, avaliar os efeitos do exercício físico, em diferentes intensidades, sobre a capacidade reprodutiva de ratas Wistar adultas que foram submetidas à superalimentação na infância.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Obesidade

O sobrepeso e a obesidade são caracterizados por um acúmulo anormal e excessivo de gordura que pode ser prejudicial para a saúde (WHO, 2014). Atualmente a obesidade é considerada uma das maiores epidemias no século XXI. Em 2013, ela atingiu mais de dois bilhões de pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, publicou dados que demonstram que adultos com idade igual ou superior a 18 anos, apresentavam taxas de sobrepeso e obesidade de 39% e 13%, respectivamente. Esta epidemia de obesidade teve seu início com a Revolução Industrial no Século XIX, cujo processo de urbanização e globalização somado à disponibilidade de alimentos mais palatáveis e industrializados, alterou o modo de vida da população e estimulou o consumo excessivo de calorias. Além disso, houve aumento do sedentarismo da população que corroborou para o estabelecimento deste quadro na população (LOOS; BOUCHARD, 2003).

A obesidade está associada às doenças cardiovasculares e metabólicas (MCGEE, 2005), como hipertensão arterial sistêmica (HAS), hiperinsulinemia, dislipidemia, hiperfagia e diabetes. Além disso, está relacionada às doenças respiratórias (DAVIS; HODGES; GILLHAM, 2006), gastrointestinais (EL-SERAG et al., 2007), musculoesqueléticas (WEARING et al., 2006) e câncer (CALLE et al., 2003).

A obesidade também afeta a reprodução dos indivíduos e está relacionada às complicações na função reprodutiva em ambos os gêneros, que pode gerar infertilidade, complicações pós-gravidez e efeitos adversos nos seus descendentes (DONNELLY et al., 2009).

Por ser considerada uma doença multifatorial, a obesidade não está restrita somente à uma fase de desenvolvimento do indivíduo, podendo se manifestar tanto em crianças e adolescentes, quanto em adultos (OGDEN et al., 2002; MILLER; ROSENBLOOM; SILVERSTEIN, 2004). Por esse motivo, a obesidade infantil é um dos grandes desafios da saúde pública mundial, e que possui maior prevalência em países em desenvolvimento. Em 2013, estimou-se que mais de 42 milhões de crianças menores que cinco anos apresentavam quadro de sobrepeso (WHO, 2014).

Vários estudos vêm sendo realizados para compreender a fisiopatologia da doença em crianças acometidas, com o intuito de tentar evitá-la e tratar as comorbidades associadas, que podem se agravar com o tempo de exposição e afetar a sua vida adulta (AZZIZ et al., 2004; OLUFADI; BYRNE, 2008; KOPPLE, 2010).

2.2 Impactos da obesidade na saúde reprodutiva feminina

A prevalência da obesidade em mulheres na idade reprodutiva pode chegar a 34% da população, e já se sabe da existência de uma relação entre adiposidade e fertilidade feminina. Os estudos de Mitchell e Rogers (1953), já demonstraram que mulheres com sobrepeso e/ou obesas correspondiam a 43% das que apresentavam algum tipo de desordem menstrual, infertilidade e aborto.

Estudos demonstram existir um limite mínimo de gordura corporal necessária para o início e manutenção dos ciclos reprodutivos femininos, de forma que meninas em condição extrema de emagrecimento apresentam atraso na menarca e até amenorreia (FRISCH; MCARTHUR, 1974; GOLDEN; SHENKER, 1994). Por outro lado, o excesso de gordura corporal está associado à redução da fertilidade, antecipação da puberdade, disfunção ovulatória e infertilidade precoce (RITTMASER et al., 1993; LAKE et al., 1997; FAROOQI et al., 2001).

A complexidade dos mecanismos que envolvem a fertilidade depende da funcionalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG), no qual a obesidade pode gerar alterações nas funções ovarianas e neuroendócrinas, com redução das taxas de ovulação, além da possibilidade de gerar quadros de infertilidade (PASQUALI, 2006). Essas

alterações afetam o balanço dos esteroides sexuais, como andrógenos e estrógenos, além da sua proteína carreadora, a globulina de ligação de esteroides sexuais (SHBG), que tem sua produção diretamente ligada à quantidade de gordura corporal. Pasquali e Casimirri (1993) demonstraram que mulheres obesas que apresentavam menor concentração de SHBG, quando comparadas com mulheres que não apresentavam o fenótipo de obesidade abdominal, apresentaram maior concentração de testosterona e estradiol circulantes. Sherman; Kurenman (1974) e Grenman et al. (1986) evidenciaram redução na concentração plasmática de progesterona e menor amplitude dos pulsos de hormônio luteinizante (LH) em mulheres obesas que não apresentavam síndrome do ovário policístico (SOP).

Adicionalmente, a obesidade durante o período de gestação, pode gerar fatores de riscos associados não somente para as mães, como também para sua prole (FLEGAL et al., 2013). Lashen; Fear; Sturdee (2004) citaram aumento da incidência de abortos espontâneos, anovulação e SOP em mulheres obesas. Além disso, o diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, anomalias congênitas e morte materna e fetal, podem ocorrer nestas pacientes (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Em recém-nascidos, essa característica materna pode acarretar distúrbios como anomalias congênitas, asfixias ao nascer e outras morbidades neonatais, como a síndrome da morte súbita infantil. Esses exemplos de anomalias congênitas são caracterizados por defeitos do tubo neural, anomalias cardiovasculares, fissura palatina, redução do tamanho e número de membros e hidrocefalia. Outras alterações, como hipoglicemia neonatal, aumento do peso, disfunção vascular e inflamação placentária também podem ser encontrados em filhotes de ratas Wistar obesas (STOTHARD et al., 2009; JOHANSSON et al., 2014).

A obesidade materna também pode provocar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos através do processo de “programação”, e gerar consequências a longo prazo para a prole (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Esses distúrbios estão associados a um estado de inflamação crônica de baixo grau característicos da obesidade que pode expor o feto a um ambiente inflamatório durante o seu desenvolvimento. Neste contexto, a exposição durante essa fase crítica, pode gerar alterações e desenvolvimento de fenótipos programados que poderão se manifestar na vida adulta. Estudos experimentais com modelo murino realizados por Yan et al. (2003), demonstraram que esse ambiente inflamatório gerou ganho de peso, adipogênese e aumento de adiposidade na prole de mães obesas.

2.3 A epigenética e a programação metabólica na obesidade

Em mamíferos recém-nascidos, diversos sistemas como o imunológico, nervoso e reprodutivo não estão completamente desenvolvidos, tendo a sua conclusão no decorrer de suas vidas. Nesta fase, estes sistemas podem sofrer alterações influenciadas por estímulos físicos, químicos e ambientais, devido à atuação de mecanismos epigenéticos sobre o seu desenvolvimento. A modulação e funcionalidade dos genes herdados e/ou características fenotípicas apresentadas pelos pais, permite que as expressões de diversas condições possam ser transmitidas para seus descendentes em gerações futuras. Portanto, hábitos adquiridos na infância podem impactar a vida adulta do indivíduo, pois há influência direta sobre o seu metabolismo e sistema endócrino. Esse fenômeno, conhecido como programação metabólica, está diretamente relacionado com maior risco de desenvolvimento de efeitos adversos à saúde na fase adulta (SENEDA, 2010; RINALDI et al., 2014; LOMNICZI; WRIGHT; OJEDA, 2015).

Os estudos que envolvem o modelo animal são úteis, pois demonstram que a sub ou superalimentação das mães podem ocasionar alterações no metabolismo das crias durante o desenvolvimento intrauterino, no período pós-natal e durante a fase de lactação, e gerar consequências no crescimento e desenvolvimento a longo prazo de órgãos e sistemas essenciais para a sobrevivência e qualidade de vida. Como exemplo, se podem citar alterações nas vias hipotalâmicas que estão diretamente envolvidas com o metabolismo e consumo energético, que podem aumentar os riscos de desenvolvimento de distúrbios metabólicos durante a vida adulta (HABBOUT et al., 2013; RINALDI et al., 2014).

Em ratos, Vickers (2014), Bei et al. (2015) e Portella et al. (2015) verificaram que a superalimentação durante o período de lactação, gerou quadro de sobrepeso e obesidade e que provocou modulação nessa janela de programação em recém-nascidos. Nesses estudos, se evidenciaram alterações do metabolismo com quadros precoces de hiperglicemia, resistência à insulina e distúrbios endócrinos relacionados à reprodução.

2.4 A relação entre a atividade física e reprodução

A inatividade física é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade, e também é o fator de risco para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares, diabete, hipertensão arterial, alguns tipos de câncer e depressão. O estilo de vida sedentário adotado por grande parte da população mundial é responsável por 3,2 milhões de mortes por ano, gerados devido ao acúmulo e agravamento dos fatores de risco associados (WHO, 2014).

Por outro lado, estudos demonstram que a prática regular de atividade física pode ser capaz de minimizar a incidência dessas doenças e elevar os índices de qualidade de vida, além de auxiliar no balanço energético, redução do peso corporal e, conseqüentemente, prevenir a obesidade (DONNELLY et al., 2009).

Os exercícios físicos são um potente atenuador a curto e longo prazos no sobrepeso/obesidade, por gerar gastos de energia, lipólise e o aumento de consumo de ácidos graxos periféricos, com o objetivo de reduzir depósitos de gordura corporal. Eles também são capazes de aumentar o percentual de massa muscular e melhorar a capacidade cardiorrespiratória de indivíduos que fazem uso dessa prática (NAKAMURA et al., 1998; MCGEE, 2005). No entanto, o potencial desses benefícios está relacionado com a sua duração, frequência e intensidade do esforço.

Os exercícios físicos são classificados em intensidade de acordo com a sua influência em parâmetros fisiológicos do indivíduo, como a frequência cardíaca máxima (FC_{max}) e consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}). Portanto, eles podem ser de caráter leve quando envolvem de 20 a 50% do VO_{2max} ; moderado ou “*Endurance*” (de 50 a 70% de VO_{2max}); e intenso ou treinamento intervalar de alta intensidade “*Hiit*” ($\geq 80\%$ de VO_{2max}) em respostas a testes de esforço máximo (LEANDRO; CASTRO, 2007).

O treinamento *Endurance*, que apresenta maior duração de tempo (e maior resistência muscular), se baseia no aprimoramento de capacidade aeróbica por meio de oxidação do musculo esquelético, ocasionada pela mobilização de gorduras durante a sua prática (DE PIANO et al., 2012; VECCHIO et al., 2013). Já o treinamento *Hiit*, realizado em períodos curtos de treinamento com maior intensidade (que prioriza o ganho de força muscular), provoca adaptações e respostas metabólicas sobre a musculatura, semelhantes ao treinamento moderado (GIBALA et al., 2006). Entretanto, provoca maior recrutamento de gorduras, inclusive no período pós-exercício, conseqüentemente aumentando a força, massa muscular e modulação mitocondrial em indivíduos que utilizam esse tipo de treinamento (TRAPP et al., 2008; ALKAHTANI et al., 2013). Estudos recentes demonstram que os treinamentos de intensidade moderada a intensa vêm se destacando por apresentarem melhores adaptações fisiológicas e metabólicas em variáveis antropométricas por meio do gasto energético (TÜRK et al., 2017).

Apesar de serem tipos diferentes de treinamento e apresentarem respostas semelhantes com relação às adaptações fisiológicas e metabólicas sobre o organismo em atividade, essas alterações podem variar de acordo com a especificidade de cada indivíduo

e devem ser sempre acompanhados de um profissional qualificado (GIBALA et al., 2006; ALFARADHI; OZANNE, 2011).

O treinamento físico tem sido utilizado em diversos períodos durante a vida do indivíduo. Entretanto, tem se estudado a respeito da utilização dessa prática durante o período gestacional, pois, segundo o Colégio Americano de Obstetrícia e Geriatria, desde 2002, os exercícios físicos moderados e diários por 30 minutos durante a gestação, são recomendados para garantir e/ou melhorar parâmetros relacionados à saúde e qualidade de vida tanto materna quanto fetal. O treinamento físico *Endurance* é indicado para mulheres durante este período, pois contribui para o menor ganho de peso e melhora da capacidade funcional, aumento do volume de líquido amniótico, redução da possibilidade de desenvolvimento de diabetes gestacional e edema em gestantes, além de exercer um efeito protetor contra o parto prematuro (DERTKIGIL et al., 2007; JUHL et al., 2008; LIU et al., 2008).

Entretanto, o *Hiit* deve ser evitado durante esse período, devido ao grande esforço realizado, pois pode ocasionar complicações gestacionais. Estudos demonstram que sua prática pode aumentar o número de abortos espontâneos e partos prematuros além de causar, a curto prazo, bradicardia fetal transitória e, a longo prazo, diminuição de peso fetal ao nascer (KARDEL; KASE, 1998).

Ainda são escassos estudos que avaliaram a influência desses diferentes modelos de treinamento físico durante a fase juvenil, previamente à fase fértil, com vistas a promover alterações futuras na reprodução e no desenvolvimento gestacional de indivíduos que foram superalimentados na infância durante a lactação.

2.5 Os modelos experimentais de obesidade em animais

Com o propósito de se estudarem os mecanismos relacionados à obesidade e doenças associadas, são necessários modelos animais experimentais. Há uma busca por similaridade dos quadros clínicos e comorbidades associadas nestes modelos com o que ocorre em humanos. Existem diversos métodos de indução de obesidade, dentre os quais se incluem os de origem genética; os provocados por lesões cerebrais (BRAY; YORK, 1979), através de lesões químicas de regiões hipotalâmicas induzidas por injeção de drogas, como o glutamato monossódico (SUZUKI et al., 1990; SEGAL; BELL; ABRAMS, 1991); indução por dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (SCLAFANI; SPRINGER, 1976) e os modelos obtidos pelo processo de redução de ninhada (MCCANCE, 1962). Estes últimos

têm sido utilizados para a indução de obesidade precoce em experimentação animal, pois permitem que os filhotes recebam alimentação adicional desde o período neonatal.

O modelo de redução de ninhada consiste em diminuir o número de filhotes logo após o nascimento, para três a quatro animais/mãe. Este processo visa a reduzir a competitividade por alimento e, conseqüentemente, aumentar o aporte de ingesta dos filhotes remanescentes (BEI et al., 2015). Essa superalimentação na lactação, fase considerada crítica no desenvolvimento de vários órgãos e sistemas dos filhotes, pode levar à desregulação hormonal, que é capaz de alterar a ontogenia das vias hipotalâmicas, gerar descontrole sobre o balanço energético, aumentar o apetite e ocasionar diminuição do gasto energético (PLAGEMANN et al., 2008).

Os estudos de Cunha et al. (2009) e Moreira et al. (2009) demonstraram tanto aumento no consumo de leite, como maior concentração de triglicerídeos em ninhadas reduzida de ratos. Com o aumento do consumo de leite, esses animais apresentaram aumento de peso no desmame, com níveis que podem variar de acordo com o tamanho da ninhada, espécie animal e de cepas. Em ratos Sprague-Dawley e Wistar, este aumento pode alcançar 10 e 56%, respectivamente. Em camundongos C57Bl/6 ou suíços, os índices podem variar em torno de 30% (HABBOUT et al., 2013).

Durante a fase de maturidade, os modelos que envolvem o método de indução de obesidade por redução de ninhada, podem variar consideravelmente quanto ao ganho de peso. Alguns deles não demonstraram aumento permanente (SHENG; BOLONAN, 2000; VELKOSKA et al., 2008), enquanto outros apresentaram ganhos de 10 a 25% maior que os animais do grupo controle, o que pode estar relacionado com o maior consumo de alimentos na vida adulta (PLAGEMANN et al., 1999; HABBOUT et al., 2013).

Outros estudos ainda demonstraram que o método de redução de ninhada acrescido da administração de dieta rica em gordura foi capaz de gerar alterações metabólicas e aumento do sobrepeso em fêmeas jovens, diminuição dos níveis de LH e estradiol no sangue por supressão da expressão de gene *kiss1*, que é responsável pela estimulação/liberação de LH. Dessa forma, este modelo pode afetar diretamente a reprodução desses animais (BEI et al., 2015; SÁNCHEZ-GARRIDO et al., 2015).

Devido às características acima citadas, além de sua plasticidade, esse modelo de indução de obesidade, pode ser usado com eficácia para estudar o excesso de peso infantil e suas conseqüências no metabolismo e reprodução dos animais a longo prazo.

Diante do exposto, o presente trabalho buscou pesquisar a interação do treinamento físico em diferentes níveis de intensidades sobre a capacidade reprodutiva e desenvolvimento fetal de ratas superalimentadas durante a fase lactente.

3. HIPÓTESE

O treinamento físico moderado (*Endurance*) e/ou o treinamento intervalado de alta intensidade (*high intensity interval training - Hiit.*) produzirão modificações metabólicas e reprodutivas em ratas superalimentadas durante a fase lactente.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar os efeitos sobre a performance reprodutiva, peso dos órgãos reprodutores e a bioquímica sérica da superalimentação na fase lactente em fêmeas submetidas ou não a diferentes tipos de treinamento físico.

4.2. Específicos

- Avaliação materna:

Período antecedente à gestação:

- Avaliar o peso corporal e consumo alimentar.
- Avaliar o metabolismo glicêmico.

Período posterior à fase gestacional:

- Pesos dos órgãos.
- Números de corpos lúteos, implantes, reabsorções, fetos vivos/mortos e peso das placentas.

- Avaliação fetal:

- Tamanho, sexo, peso e presença de malformações.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

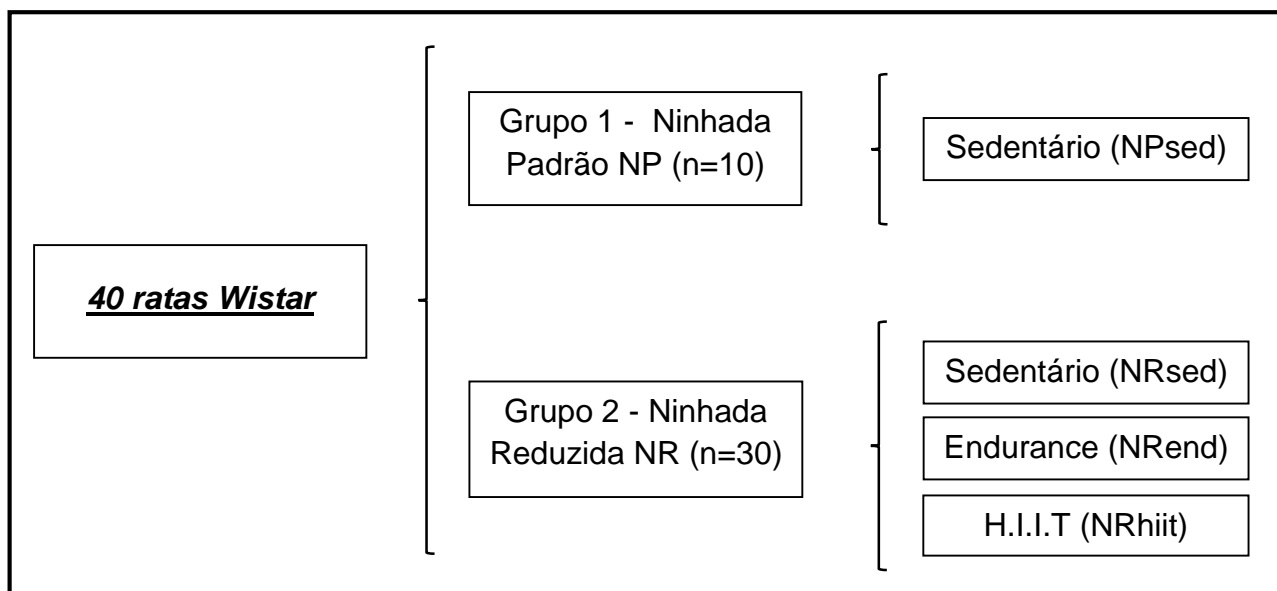
Foram utilizadas 40 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769), que foram distribuídas em dois grupos experimentais: um com 10 ratas oriundas de ninhada padrão, que continham 10 filhotes fêmeas por mãe (NP) e que não foram submetidas ao exercício ou sedentárias (NPsed) e outro com 30 ratas oriundas de ninhada reduzida, que continham quatro filhotes fêmeas por mãe (NR) (Figura 1). Os animais foram fornecidos pelo biotério de produção e mantidos no biotério de experimentação do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em mini-isoladores da marca ALESCO® (Brasil), de 48,3 x 33,7 x 21,4 cm de dimensões, forradas com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho aramado para disposição de ração do tipo peletizada e bebedouro do tipo mamadeira de garrafa de polipropileno, provido de água filtrada. Os biotérios do CBR estão registrados com o nº 01.0048.2013 de CIAEP (Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa).

As gaiolas foram mantidas em *Racks* ventilados ALESCO® (Brasil) e temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ$ C. Os animais foram alojados em salas com dispositivo para manter a iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 horas. A proporção de animais foi de cinco fêmeas por gaiola. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA/UFJF - protocolo nº 045/2015) (ANEXO).

5.2. Formação dos subgrupos de ninhada reduzida (superalimentadas)

Os 30 animais advindos do processo de redução de ninhadas (NR), foram subdivididos em três subgrupos, sendo um grupo sedentário (NRsed) (N=10), um grupo submetido a um programa de treinamento de *Endurance* de intensidade moderada (NREnd) (N=10) e um grupo submetido a um programa de treinamento intervalado de alta intensidade (*high intensity interval training - Hiit*) (NRhiit) (N=10) (Figura 1).

Figura 1: Delineamento experimental do estudo com distribuição dos animais nos grupos experimentais



Fonte: Arquivo pessoal

5.3. Estabelecimento do tamanho da ninhada por mãe.

No segundo dia de vida pós-parto, as crias oriundas dos dois grupos, NP e NR, foram remanejadas de forma a permanecerem dez e quatro filhotes fêmeas para cada mãe respectivamente, a fim de proporcionar superalimentação nas crias do último grupo. O protocolo foi realizado pelo Biotério de Produção do Centro de Biologia da Reprodução, seguindo protocolo proposto por Bei et al. (2015). O desmame desses animais ocorreu no 21º dia de vida (Figura 2).

5.4. Determinação do consumo máximo de oxigênio e protocolo de treinamento

Antes, durante e após a realização dos programas de treinamento, todos os animais foram submetidos à avaliação do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx.}}$) em esteira metabólica (Panlab®, Barcelona - Espanha) com a utilização do analisador de gases (Harvard Apparatus®, Barcelona - Espanha) Além do critério de avaliação, os resultados foram utilizados para um melhor ajuste na prescrição das cargas de treinamento, tornando-a individualizada e de acordo com a capacidade aeróbica de cada animal. Antes do primeiro teste de $VO_{2\text{máx.}}$, os animais foram adaptados ao exercício em esteira por cinco dias consecutivos, em um período de 10-15 minutos/dia. Após quatro semanas de treinamento, os animais foram submetidos novamente ao teste de $VO_{2\text{máx.}}$ com o objetivo de ajustar as

cargas. Os animais realizaram o exercício em esteira comum (Insight®, Ribeirão Preto/SP - Brasil) (Figura 3) a uma inclinação de 5° até a exaustão. O procedimento se iniciou a uma velocidade de 6 metros/min e foi aumentado gradativamente ao nível de 3 metros/min em intervalos de 3 minutos até que estivessem inaptos a continuar o exercício, quando se determinou o seu término.

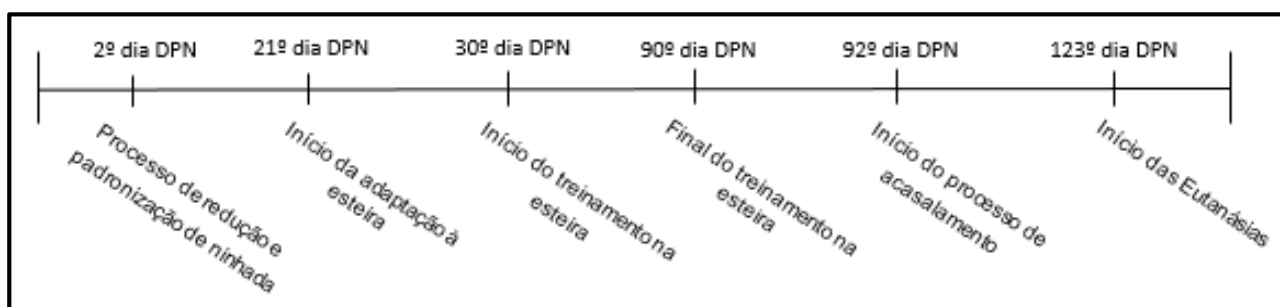
O protocolo do treinamento de *endurance* moderado foi aplicado aos animais do grupo NREnd e compreendeu três sessões semanais, com duração de 60 minutos cada, em intensidade de 65-70% do $VO_{2m\acute{a}x}$, durante oito semanas consecutivas. Cada sessão de treinamento foi dividida em 10 minutos para aquecimento (a 50% $VO_{2m\acute{a}x}$.) e 50 minutos para o exercício propriamente dito (a 65-70% do $VO_{2m\acute{a}x}$.). O ajuste da carga foi realizado após as primeiras quatro semanas de treinamento, a partir de uma nova avaliação do $VO_{2m\acute{a}x}$.

As sessões do treinamento intervalado de alta intensidade (Hiit) foram aplicados aos animais do grupo NRhiit e duraram 40 minutos, sendo divididos em 10 minutos para aquecimento (a 50% $VO_{2m\acute{a}x}$.) e seis períodos de 3 minutos de exercícios em alta intensidade (a 85-90% do $VO_{2m\acute{a}x}$.) intercalados com períodos de 2 minutos em baixa intensidade (a 50% $VO_{2m\acute{a}x}$.), totalizando 30 minutos para a parte do exercício propriamente dito. O ajuste da carga de treinamento foi realizado após as primeiras quatro semanas de treinamento, a partir de uma nova avaliação do $VO_{2m\acute{a}x}$. Todos os protocolos de treinamento foram iniciados no desmame dos animais, aos vinte e um dias de vida e foram adaptados a partir dos protocolos descritos por Moreira et al. (2013).

Os animais dos grupos NPsed e NRsed constituíram os animais sedentários e, portanto, não foram submetidos a exercícios físicos.

Os procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos podem ser demonstrados na figura 2.

Figura 2: Linha temporal dos procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3: Imagem que demonstra a esteira comum utilizada para realização dos treinamentos físicos dos animais.



Fonte: Arquivo pessoal

5.5. Avaliação do peso corporal e consumo alimentar

Durante o período do nascimento dos animais até os 90 dias PN, dados quanto à evolução de peso corporal total (g) e a estimativa de consumo alimentar médio de 24 horas foram anotados.

5.6. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Após os 90 dias PN, os animais foram submetidos ao jejum alimentar de seis horas e foi coletado sangue para aferição de glicemia capilar no T0 (tempo zero). Em seguida foram administrados 2g/kg de peso corporal de solução de glicose a 50%, por via intragástrica, coletando-se a partir de então, amostras de sangue nos tempos T1 (15 min), T2 (30min), T3 (60min) e T4 (120min) (SILVA et al., 2015). Para a coleta de sangue, foi utilizado o método de lancetamento da cauda e todas as amostras foram analisadas em glicosímetro capilar AccuChek Advanced (Roche®, Alemanha).

5.7. Avaliação de tolerância à insulina (TTI)

O TTI foi realizado uma semana após o TOTG e novamente em jejum alimentar de seis horas. Todos os animais receberam insulina NPH (Novolin N® – Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) pela via intraperitoneal na dose de 1 UI/kg de peso corporal) após

a medição da glicemia sanguínea no tempo 0 (basal) e, posteriormente, coletadas amostras nos tempos T5 (5min), T15 (15min), T30 (30min) e T45 (45min) (HIRATA et al., 2003). Para a coleta de sangue, também foi utilizado o método de lancetamento da cauda e todas as amostras foram analisadas em glicosímetro AccuChek Advanced (Roche®, Alemanha).

5.8. Acasalamento dos animais

Após os 90 dias PN, todos os animais de cada grupo foram submetidos ao acasalamento com machos reprodutores fornecidos pelo biotério do CBR. O primeiro dia de gestação foi confirmado pela presença de tampão vaginal ou espermatozoide no esfregaço vaginal. No 20º dia de gestação, as fêmeas foram pesadas e eutanasiadas.

5.9. Eutanásia

As fêmeas adultas foram eutanasiadas por exsanguinação cardíaca após anestesia com complementação por ruptura diafragmática (CONCEA, 2013). O protocolo anestésico utilizado foi a combinação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina na dose de 90 mg/kg (Vetanarcol®, Konig – Brasil) e o sedativo e miorrelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg (Kensol®, Konig – Brasil). Os dois fármacos foram misturados e aplicados unicamente pela via intraperitoneal segundo protocolo anestésico preconizado por Wolfensohn; Lloyd (1994). Foi aguardado o tempo mínimo de 5 minutos para se proceder à ruptura diafragmática. Antes desta, e após a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro sanguíneo foi separado, aliquotado e armazenado a -80° C para as análises bioquímicas.

5.10. Análises bioquímicas séricas

Os analitos como glicose e creatinina séricas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, e frações como as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL) foram determinadas por *kits* comerciais da marca Roche® ao se utilizar o aparelho analisador Cobas, Modelo C 111, também da marca da Roche® (Indianápolis, Estados Unidos).

5.11. Dissecção, pesagem dos órgãos e análises fetais

Após a eutanásia das mães, foram avaliados os seus respectivos comprimentos nasoanais com auxílio de paquímetro. Em seguida foi feita a necropsia e os seguintes órgãos foram removidos, pesados em balança de precisão, e posteriormente avaliados os pesos relativos dos ovários direito e esquerdo, rins, coração, fígado, glândulas adrenais (esquerda e direita), gorduras retroperitoneal e perigonadal e útero. Este último foi pesado com seu conteúdo e a massa corporal final das mães foi considerada pela diferença entre o peso obtido antes da eutanásia e o peso do útero com seu conteúdo. Também foram obtidos os pesos e números de fetos vivos e mortos, que foram também separados por sexo, bem como suas respectivas placentas foram pesadas. O comprimento nasoanal fetal foi determinado através da utilização de paquímetro digital.

Os fetos foram eutanasiados por deslocamento cervical (CONCEA, 2013). Procedeu-se à observação da morfologia externa do feto em que foram considerados os aspectos dos membros torácicos e pélvicos, com observação da presença ou não de polidactilia e sindactilia. No crânio, verificou-se a presença de craniosquisis, micro ou anoftalmia, fenda palatina, lábio leporino e macro e microglossia (YAKUBU et al., 2010). As análises foram realizadas em lupa estereoscópica Steime SV-6 (Zeiss® - Alemanha).

Os corpos lúteos foram contados também em lupa estereoscópica Steime SV-6 (Zeiss® - Alemanha) e quantificados o número total de implantes e reabsorções nos cornos uterinos.

A partir dessas análises, foram calculados o índice de gestação = (número total de fêmeas acasaladas que ficaram prenhes/número de fêmeas acasaladas não prenhes) × 100; índice de implantação = (número total de implantações/número total de corpos lúteos) × 100; índice de malformações fetais (número total de malformações/número total de fetos); índice de perdas pré-implantações (número total de corpos lúteos - número total de implantações/número total de corpos lúteos) × 100 (BALASINOR et al., 2002).

5.12. Análises estatísticas

Foi realizado teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos dados. Para comparação entre o NRsed e o NPsed foi utilizado o teste t de Student independente para os dados com distribuição normal ou teste de Mann Whitney para os dados que não tiveram distribuição normal. Para a comparação entre os três subgrupos formados por animais de ninhadas reduzidas NRsed, NReud e NRhiit, foi utilizado o teste de análise de variâncias (ANOVA One Way) com pós-teste de Tukey para os dados com distribuição

normal. Para a mesma comparação para dados não homocedásticos, os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney foram utilizados. Foi utilizado o teste Qui-quadrado para a análise das variáveis qualitativas de avaliação dos índices reprodutivos e anormalidades fetais. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os programas SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences), versão 21 (Nova York, Estados Unidos) e Graphpad Prism® – Versão 5 (La Jolla, Estados Unidos).

6. RESULTADOS

6.1. Artigo enviado a publicação

De: Journal of Developmental Origins of Health and Disease
Enviado: quinta-feira, 25 de janeiro de 2018 14:58
Para: vini.mgcosta@gmail.com
Assunto: Journal of Developmental Origins of Health and Disease - ManuscriptID DOHaD-01-18-OA-0935

25-Jan-2018

Dear Mr. Costa:

Your manuscript entitled "EVALUATION OF LITTER OVERFEEDING IN CHILDHOOD ON METABOLIC, BIOCHEMICAL AND REPRODUCTIVE PARAMETERS OF FEMALE WISTAR RATS" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Your manuscript ID is DOHaD-01-18-OA-0935.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Sincerely,
Journal of Developmental Origins of Health and Disease Editorial Office

=====
Journal of Developmental Origins of Health and Disease (JDOHaD) is indexed in Thomson Reuters Citation Index®. All content from Volume 1 onwards is indexed by ISI, and its 2012 Impact Factor is 1.207. The Journal is additionally indexed by MEDLINE.

To keep up to date with the latest news from JDOHaD register for alerts:
<http://journals.cambridge.org/doh-alerts>

EVALUATION OF LITTER OVERFEEDING IN CHILDHOOD ON METABOLIC, BIOCHEMICAL AND REPRODUCTIVE PARAMETERS OF FEMALE WISTAR RATS

¹Costa, V.M.G.; ²Andreazzi, A.E.; ¹Bolotari, M.; ¹Lade, C.G.;¹Guerra, O.M.; ¹Peters, M.V.;

¹*Reproductive Biology Center, Institute of Biological of Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.*

²*Laboratory of Physiology, Department of Physiology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.*

ABSTRACT:

Overweight/obesity has become a worldwide epidemic, and factors such as sedentary lifestyle and inadequate eating habits directly contribute to the development of this condition. Studies show that rapid weight gain in critical stages of development, such as lactation, is associated with the development of obesity, cardiovascular disease, and diabetes. In addition to metabolic changes during adulthood, overweight/obesity may influence the reproductive function of the population. Therefore, the present work sought to evaluate the long-term effects of early postnatal overnutrition on reproduction, metabolism and biochemistry of Wistar females from a reduced litter. Twenty Wistar rats from normal litters (NL = 10) and small litters (SL = 4) were used. Overweight/obesity was induced by litter size. At 90 days of age the animals were euthanized on the 20th day of gestation. Metabolic, biochemical and reproductive variables were collected and analyzed. This study was approved by CEUA / UFJF (045/2015). Weight, intake, and insulin tolerance in SL animals were higher than in NL ($p < 0.05$). There were no significant differences in naso-anal distance, relative organ weight, retroperitoneal and perigonadal fats, as well as oral glucose tolerance test, biochemical parameters, gestation and implantation index. It was concluded that litter reduction method is efficient in inducing overweight in SL females, with changes in metabolic and reproduction variables points.

Key words: Litter reduction, infant overfeeding, metabolic and reproductive disorders.

6.2. Artigo a ser submetido para publicação

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA DE FÊMEAS SUPERALIMENTADAS NA INFÂNCIA EXPOSTAS A DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO

¹Costa, V.M.G.; ²Andreazzi, A.E.; ¹Bolotari, M.; ¹Lade, C.G.; ¹Guerra, O.M.; ¹Peters, M.V.

¹ Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

² Laboratório de Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

RESUMO:

A população mundial tem crescido exponencialmente com o passar dos anos e, concomitantemente a ela, a disponibilidade de alimentos mais palatáveis e ricos em gorduras saturadas vem alcançando milhões de pessoas, com conseqüente aumento dos índices de sobrepeso/obesidade. Estudos têm evidenciado o rápido ganho de peso em neonatos, característica essa que contribui diretamente para o surgimento de distúrbios metabólicos, doenças respiratórias e cardiovasculares, levando ao desenvolvimento de sobrepeso/obesidade a curto ou longo prazo. A isto, tem se implicado a programação metabólica, que corresponde a períodos críticos de desenvolvimento do indivíduo com maior susceptibilidade a alterações do meio intrauterino e na fase lactente. Além dessas alterações, o sobrepeso/obesidade pode influenciar na função reprodutiva de mulheres adultas, provocando elevados índices de infertilidade na população. Considerando o exercício físico, como fator primário de tratamento do sobrepeso/obesidade, pretendeu-se avaliar através de análises metabólicas, bioquímicas séricas e reprodutivas, se o exercício físico, em diferentes intensidades, é capaz de influenciar a saúde reprodutiva de fêmeas Wistar superalimentadas na infância pelo processo de redução de ninhada reduzida. Foram utilizadas 40 ratas Wistar provenientes de ninhadas padrão (NP=10) e ninhadas reduzidas (NR=4). O sobrepeso/obesidade foi induzido pelo processo de redução de ninhada. Após o desmame, três vezes/semana durante 60 dias, os animais foram submetidos aos diferentes protocolos de treinamento moderado *Endurance* e de alta intensidade *Hiit*. Aos 90 dias de vida os animais foram acasalados e eutanasiados no 20^o dia de gestação. Variáveis metabólicas, bioquímicas e reprodutivas foram coletadas e analisadas. Peso, consumo, índice de tolerância à insulina, creatinina, ALT e LDL apresentaram diferenças significativas

entre os grupos. Não houve diferenças significativas no comprimento nasoanal, peso relativos de órgãos, gorduras retroperitoneal e perigonadal, além dos índices de tolerância oral à glicose, gestação, implantação, reabsorção, perdas pré e pós-implantação. Concluiu-se que os exercícios físicos foram eficientes em alterar parâmetros metabólicos, bioquímicos e reprodutivos em animais superalimentados pelo processo de redução de ninhada. Entretanto, animais do grupo NREnd apresentaram melhores dados bioquímicos e metabólicos quando comparados com os do grupo NRhiit.

PALAVRAS-CHAVE: infertilidade feminina, exercício físico, redução de ninhada, superalimentação infantil, epigenética, distúrbios metabólicos e reprodutivos.

6.3. Resumos apresentados em congressos

MORPHOLOGY AND METABOLISM IN FEMALE WISTAR RATS SUBMITTED TO DIFFERENT OVERWEIGHT INDUCTION METHODS

Carlos Gabriel de Lade¹, Marcella Martins Terra¹, Ana Eliza Andreazzi¹, Vera Maria Peters¹, Vinícius Moreira Gonçalves Costa¹, Mariana Bolotari¹, Martha de Oliveira Guerra¹.

¹Centro de Biologia da Reprodução. Universidade Federal de Juiz de Fora. Brasil.

V Congresso Nacional, IV Reunião Científica Regional, II Simpósio de Métodos Alternativos. Realizado entre os dias 16 e 19 de novembro de 2016 em Mar del Plata, Argentina.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROMOTOR DE FÊMEAS WISTAR SUPERALIMENTADAS DURANTE A LACTAÇÃO

¹Rocha, B.M.O.; ¹Bolotari, M.; ¹Silva, C.R.; ¹Lade, C.G.; ¹Costa, V.M.G.; ¹Andreazzi, A.E.; ¹Guerra, M.O.; ¹Peters, V.M.

¹Centro de Biologia da Reprodução/ Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

XXXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Realizada entre os dias 3 e 6 de setembro de 2017 em Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO DURANTE A INFÂNCIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROMOTOR DE MACHOS WISTAR

¹Silva, C.R.; ¹Bolotari, M.; ¹Rocha, B.M.O.; ¹Lade, C.G.; ¹Costa, V.M.G.; ¹Andreazzi, A.E.; ¹Guerra, M.O.; ¹Peters, V.M.

¹Centro de Biologia da Reprodução/ Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

XXXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Realizada entre os dias 3 e 6 de setembro de 2017 em Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.

7. COMENTÁRIOS GERAIS

O modelo de indução de obesidade por redução de ninhada foi eficaz em alterar o peso e o consumo dos animais superalimentados (NRsed) em relação ao grupo controle (NPsed) durante a fase lactente. Porém, ainda que o consumo dos animais NRsed fosse significativamente maior que o do grupo NPsed, essa diferença de peso não se manteve a partir da segunda semana de desenvolvimento pós-desmame.

O treinamento *Hiit* foi capaz de reduzir as médias de peso corporal dos animais superalimentados (NRhiit) em relação aos animais do grupo NRsed, porém sem diferença estatisticamente significativa. Os parâmetros de metabolismo de glicêmico, avaliados no teste de tolerância à insulina (TTI) e teste oral à glicose (TOTG) não demonstraram diferenças significativas do grupo NRhiit quando comparado com o NRsed. Entretanto, este mostrou-se eficaz em reduzir as médias de consumo alimentar e os níveis de colesterol de fração (LDL) em relação aos grupos NReud e NRsed.

Os animais do treinamento *Endurance* (NReud) apresentaram após o desmame, médias de peso corporal também inferiores ao grupo NRsed, porém sem diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, apresentaram redução das médias de consumo alimentar e de resistência à insulina (TTI), assim como nos níveis séricos de creatinina e ALT, quando comparados com os animais dos grupos NRhiit e NRsed.

Não houve diferenças significativas nos pesos relativos das gorduras e órgãos dos animais estudados neste trabalho.

Com relação aos parâmetros reprodutivos, foram observadas alterações no índice de reabsorção, perdas pós-implantação e peso de fetos fêmeas entre os grupos NRsed e NPsed. Porém, essa diferença estatística, para os índices reprodutivos citados acima, não se mostrou de relevância biológica, uma vez que o índice de nascimento dos animais permaneceu dentro dos padrões observados na colônia de experimentação do próprio CBR. Entretanto, a superalimentação materna durante a fase lactente foi capaz de alterar o peso dos fetos fêmeas em suas crias, sugerindo assim a influência de mecanismos epigenéticos sobre o desenvolvimento fetal.

Por fim, os exercícios físicos, em suas diferentes intensidades, não foram capazes de alterar os padrões reprodutivos, assim como reduzir significativamente os pesos dos fetos dos animais dos grupos NReud e NRhiit em relação ao grupo NRsed.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que a superalimentação materna durante a fase lactente, gerada pelo protocolo de redução de ninhada, foi capaz de afetar o desenvolvimento da prole de ratas Wistar. Entretanto, os exercícios físicos, realizados de acordo com a proposta do presente trabalho, não foram capazes de reverter ou impedir o desenvolvimento desse fenótipo nas crias. Por outro lado, entre os treinamentos, o de intensidade moderada *Endurance* se mostrou mais eficiente no controle tanto de variáveis metabólicas, quanto de bioquímicas dos animais que passaram pelo processo de superalimentação.

9. REFERÊNCIAS

- ACOG Committee opinion. Exercise during pregnancy and the postpartum period. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 99 n.17, p. 1-3, 2002.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontiers in Genetics**, v. 2, n. June, p. 1–13, 2011.
- ALKAHTANI, S. A. et al. Effect of interval training intensity on fat oxidation, blood lactate and the rate of perceived exertion in obese men. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2013.
- AZZIZ, R. et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2745–2749, 2004.
- BALASINOR, N. et al. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 190, n. 1–2, p. 159–166, 2002.
- BEI, F. et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–12, 2015.
- BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 719 LP-809, 1979.
- CALLE, E. et al. *New England Journal*. v. 348, n. 17, p. 1625–1638, 2003.
- DAVIS, J. N.; HODGES, V. A.; GILLHAM, M. B. Physical activity compliance: Differences between overweight/obese and normal-weight adults. **Obesity**, v. 14, n. 12, p. 2259–2265, 2006.
- DE PIANO, A. et al. Long-term effects of aerobic plus resistance training on the adipokines and neuropeptides in nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n. 11, p. 1313–1324, 2012.
- DE SOUZA RODRIGUES CUNHA, A. C. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 435–442, 2009.
- DERTKIGIL, M. S. J. et al. Variation in the amniotic fluid index following moderate physical activity in water during pregnancy. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 86, n. 5, p. 547–552, 2007.
- DONNELLY, J. E. et al. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 2, p. 459–471, 2009.
- EL-SERAG, H. B. et al. Obesity increases oesophageal acid exposure. **Gut**, v. 56, n. 6, p. 749–755, 2007.
- FLEGAL, K. M. et al. CLINICIAN ' S CORNER Among US Adults , 1999-2008. **Journal of American Medical Association**, v. 303, n. 3, p. 235–241, 2013.

- GIBALA, M. J. et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: Similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. **Journal of Physiology**, v. 575, n. 3, p. 901–911, 2006.
- GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Physiology & Behavior**, v. 79, p. 47–63, 2003.
- HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term. p. 553–562, 2013.
- HIRATA, A. E. et al. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1369–1381, 2003.
- JOHANSSON, S. et al. Maternal overweight and obesity in early pregnancy and risk of infant mortality: a population based cohort study in Sweden. **Bmj**, v. 349, n. dec02 6, p. g6572–g6572, 2014.
- JUHL, M. et al. Physical exercise during pregnancy and the risk of preterm birth: A study within the Danish National birth cohort. **American Journal of Epidemiology**, v. 167, n. 7, p. 859–866, 2008.
- KARDEL, K. R.; KASE, T. Training in pregnant women: effects on fetal development and birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, n. 2, p. 280–286, 1998.
- KOPPLE, J. D. Obesity and Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 5, p. S29–S30, 2010.
- KOZAK, R. et al. Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. **Developmental Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 75–82, 2000.
- LASHEN, H.; FEAR, K.; STURDEE, D. W. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: Matched case-control study. **Human Reproduction**, v. 19, n. 7, p. 1644–1646, 2004.
- LEANDRO, C.; CASTRO, R. Adaptative mechanisms of the immune system in response to physical training. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 81, p. 311–316, 2007.
- LIU, J. et al. Does physical activity during pregnancy reduce the risk of gestational diabetes among previously inactive women? **Birth**, v. 35, n. 3, p. 188–195, 2008.
- LOMNICZI, A.; WRIGHT, H.; OJEDA, S. R. Frontiers in Neuroendocrinology Epigenetic regulation of female puberty. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 36, p. 90–107, 2015.
- LOOS, R. J. F.; BOUCHARD, C. Obesity--is it a genetic disorder? **Journal of internal medicine**, v. 254, n. 5, p. 401–25, 2003.
- MCCANCE, R. A. 6 October. v. 3, 1962.
- MCGEE, D. L. Body mass index and mortality: A meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 2, p. 87–97, 2005.

MILLER, J.; ROSENBLOOM, A.; SILVERSTEIN, J. Childhood obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4211–4218, 2004.

MOREIRA, A S. B. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 19, n. 11, p. 805–10, 2009.

NAKAMURA, K. et al. Increase in body mass index and waist circumference as outcomes of working overtime. **Occupational Medicine**, v. 48, n. 3, p. 169–173, 1998.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence and Trends in Overweight Among. **Jama**, v. 288, n. 14, p. 1728–1732, 2002.

OLIVEIRA, F.; LEMOS, C. Obesidade e reprodução. **Femina**, v. 38, n. 5, p. 245–249, 2010.

OLUFADI, R.; BYRNE, C. D. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 6, p. 697–706, 2008.

PASQUALI, R. Obesity, fat distribution and infertility. **Maturitas**, v. 54, n. 4, p. 363–371, 2006.

PASQUALI, R.; CASIMIRRI, F. The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. **Clinical Endocrinology**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 1993.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**, v. 836, n. 1–2, p. 146–155, 1999.

PORTELLA, A. K. et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 66–73, 2015.

RINALDI, W. et al. Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. p. 1–9, 2014.

SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A. et al. Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female : Influence of the Loss of Ovarian Secretion. v. 156, n. August, p. 2984–2998, 2015.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology and Behavior**, v. 17, n. 3, p. 461–471, 1976.

SENEDA, M. M. Epigenética e neo-oogênese : novos conceitos em foliculogênese. p. 111–117, 2010.

SHENG, H. B. L. C. Perinatal Feedings Adversely Affect Lipogenic Activities but Not Glucose Handling in Adult Rats. v. 48, n. 5, p. 668–673, 2000.

SILVA, A. et al. Acute and Subchronic Antihyperglycemic Activities of *Bowdichia virgilioides* Roots in Non Diabetic and Diabetic Rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

STOTHARD, K. J. et al. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies. **Jama**, v. 301, n. 6, p. 636, 2009.

SUZUKI, N. et al. Hypothalamic obesity due to hydrocephalus caused by aqueductal stenosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 53, n. 12, p. 1102–1103, 1990.

TAN, M. H. et al. Physical training in diabetic rats: effect on glucose tolerance and serum lipids. **J Appl Physiol**, v. 52, n. 6, p. 1514–1518, 1982.

TRAPP, E. G. et al. The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 4, p. 684–691, 2008.

TÜRK, Y. et al. High intensity training in obesity: a Meta-analysis. **Obesity Science & Practice**, v. 3, n. 3, p. 258–271, 2017.

VECCHIO, F. B. D.; GALIANO, L. M.; COSWIG, V. S. Aplicações do exercício intermitente de alta intensidade na síndrome metabólica Applications of high-intensity intermittent. **Rev Bras Ativ Fís Saúde**, v. 18, n. 6, p. 669–687, 2013.

VELKOSKA, E. et al. Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats 1,2. **J. Nutr**, v. 138, n. January, p. 1622–1627, 2008.

VICKERS, M. H. Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. p. 2165–2178, 2014.

WEARING, S. C. et al. The impact of childhood obesity on musculoskeletal form. **Obesity Reviews**, v. 7, n. 2, p. 209–218, 2006.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. **World Health**, p. 176, 2014.

YAKUBU, M. et al. Abortifacient Potential of Aqueous Extract of Senna alata Leaves in Rats. **Journal of Reproduction and Contraception**, v. 21, n. 3, p. 163–177, 2010.

YU, W. H. et al. Role of leptin in hypothalamic–pituitary function. **Physiology**, v. 94, n. February, p. 1023–1028, 1997.