

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
NÚCLEO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO  
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

**Marcella Martins Terra**

**Treinamento físico em fêmeas alimentadas com dieta hipercalórica reverte à  
adiposidade e alterações metabólicas na prole?**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Eliza Andreazzi**

**Juiz de Fora**

**2018**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
NÚCLEO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO  
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

**Marcella Martins Terra**

**Treinamento físico em fêmeas alimentadas com dieta Hipercalórica reverte à adiposidade e alterações metabólicas na prole?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde Brasileira.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Eliza Andreazzi**

**Juiz de Fora**

**2018**

Marcella Martins Terra

**Treinamento físico em fêmeas alimentadas com dieta hipercalórica reverte a adiposidade e alterações metabólicas na prole?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Eliza Andreazzi  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Mateus Camaroti Laterza  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscilla Helena D'Almeida de Souza Santana  
Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC/JF

---

Prof. Dr. Hussen Machado  
SUPREMA

Aos meus pais Sandra e Benevenuto, irmãos, e a toda minha família que, com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Talvez seja este o capítulo mais difícil de escrever diante de todo o trabalho, pois nunca se conquista algo sozinho, e muitos são aqueles que merecem meu agradecimento.

Agradeço a Deus todos os dias, pela família que tenho e pela oportunidade que me surgiu de conhecer o Centro de Biologia da Reprodução/CBR, e por guiar meus passos até aqui.

Ao conhecer o CBR ainda na graduação, não sabia o mundo de oportunidades que se abririam para mim, o quanto eu poderia aprender e crescer profissionalmente e pessoalmente, e devo muito de tudo que aprendi e cresci à Professora Dra. Vera M. Peters. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, amizade, pelos conselhos, pela paciência e por ser um exemplo de profissionalismo e competência. Admiro sua dedicação e amor ao trabalho e à pesquisa. Agradeço a oportunidade de tê-la como orientadora na Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado.

Agradeço a Professora Dra. Martha de O. Guerra, por toda sabedoria compartilhada, opiniões, críticas, total colaboração em solucionar as dúvidas que foram surgindo durante o trabalho e por todas as palavras de incentivo.

Agradeço a Professora Dra. Ana Eliza Andreazzi, por acreditar em mim no início desse trabalho e compartilhar comigo a ideia do projeto, pela colaboração imprescindível na realização desse trabalho, orientação e por contribuir para o meu crescimento profissional.

À Tamiris, por ter sido uma grande companheira na realização de todo trabalho, pela disposição em dividir as dificuldades, sempre dedicada e comprometida, se tornando uma grande amiga.

Ao Audryo por ser um exemplo de determinação, dedicação e prestatividade. Sempre disposto a ajudar, não importa o dia ou hora. Sua ajuda foi imprescindível para a realização desse trabalho, certeza que será um profissional brilhante.

À Jessica Ferraz e Dejenane Granato, que também contribuíram muito na execução de todo trabalho.

À querida Lorena, Evelise e Flávia, agradeço pela companhia diária, pelo ombro amigo, pelas conversas e viagens. Certamente são pessoas que levarei no coração por toda vida.

A minha amiga Bárbara, pela amizade, por escutar por várias vezes os meus desabaços, medos e choros. Por estar sempre por perto me contagiando com sua alegria "Colorida", me fazendo rir mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os amigos e companheiros de trabalho no CBR Laboratórios e Biotério, pela convivência diária, e que tanto me ajudaram cada um à sua maneira.

Aos meus amigos de graduação Waldilene, Miqueias e Luciana Chedier, que fizeram parte de todas as minhas conquistas desde então, sendo amigos com quem pude contar sempre.

Ao professor Paulo Mathias por nos receber tão bem em seu laboratório em Maringá e estar sempre disposto a contribuir.

Ao Professor Wolfgang Langhans por ter me dado a oportunidade de trabalhar por um ano com sua equipe no Laboratório de Fisiologia da ETH/Zurich, com certeza foi uma das melhores experiências da minha vida e do doutorado.

Aos amigos de laboratório em Zurich, que compartilharam comigo toda sabedoria com muita paciência, Nadja, Wan-Hui, Sharon, Myrtha e Nino. Danke!

Agradeço também aos amigos que fiz em Zurich e tornaram esse um ano mais leve e divertido. A Pri que dividiu comigo todas as dificuldades de recém chegada e tornou tudo mais fácil. À Ju, Bê e Vlad, Vanessa e Roberto, agradeço por todo momento compartilhado.

Ao Lucas pelo companherismo durante esses 4 anos, por sua confiança e constante palavras de incentivo.

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR/UFJF), pelo fornecimento das instalações, laboratórios, modelo experimental, funcionários e toda a logística para o desenvolvimento do projeto.

Às Redes Mineiras TOXIFAR e Bioterismo - FAPEMIG pelo financiamento do projeto. A FAPEMIG pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduiche.

A CAPES pela concessão da bolsa.

À Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal e Juiz de Fora, pela colaboração e auxílio na participação de congressos.

A toda minha família que mesmo de longe, sempre me apoiaram a concluir mais essa conquista. Principalmente a minha madrinha Inaia e meu padrinho Sávio.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcuta)

## RESUMO

Gestantes com acesso à superalimentação estão mais propensas a expor o feto ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos quando adultos. O treinamento físico é um mecanismo de prevenção e tratamento desses distúrbios, pois promove melhoria no metabolismo e composição corporal. Este estudo avaliou o efeito protetor do exercício físico contra possíveis alterações metabólicas na geração F1 e F2, cujas mães foram submetidas à dieta high sugar/high fat (HS/HF). Ratas Wistar da geração F0 foram distribuídas em quatro grupos (n=10): CSed e CExe; DHSed e DHExe. Dos 21 dias de vida até o fim da lactação, os animais CSed/CExe receberam dieta padrão e animais DHSed/DHExe receberam dieta HS/HF. Animais dos grupos CExe/DExe realizaram treinamento físico, dos 21 aos 120 dias. Machos e fêmeas da geração F1 e F2 consumiram ração normocalórica e não realizaram treinamento físico sendo distribuídos em grupos (n=10) de acordo com a geração materna ao qual pertenciam. Na geração F0 houve aumento do peso corporal, adiposidade, glicose e perfil lipídico; o exercício reduziu os parâmetros bioquímicos entre os grupos DHSed/DHExe. O exercício materno teve efeito nas gerações futuras, sendo mais evidente em machos, reduzindo a adiposidade bem como as concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides e preveniu efeitos prejudiciais da intolerância à glicose. O consumo materno de dieta rica em carboidratos simples e lipídeos, aumentou os riscos para a saúde tanto na mãe quanto na prole, mostrando que o consumo de dieta HS/HF promove alterações metabólicas na prole, provavelmente por mecanismos epigenéticos. Porém o treinamento físico realizado pela geração F0 apresentou efeito protetor quanto a tais efeitos.

Palavras-chave: Obesidade, Obesidade transgeracional, Dieta hipercalórica, Exercício físico, Epigenética

## ABSTRACT

Pregnant individuals who overfeed are more likely to expose the fetus to the development of metabolic disorders in their adulthood. Physical training is a mechanism for the prevention and treatment of these disorders, since it improves metabolism and body composition. This study evaluated the protective effect of physical exercise against possible metabolic changes in generations F1 and F2, whose mothers were submitted to a high sugar/high fat (HS/HF) diet. Wistar rats from generation F0 were distributed in four groups (n=10): CSed and CExe; DHSed and DHExe. From 21 days of age until the end of the lactation period, CSed/CExe animals received standard feed, and DHSed/DHExe animals received HS/HF diet. Animals from groups CExe/DExe underwent physical training from 21 to 120 days of age. Males and females in generations F1 and F2 received normocaloric feed and did not perform physical training, being distributed into four groups (n=10) according to the maternal generation to which they belonged. In generation F0, there was an increase in body weight, adiposity, glucose and lipidic profile; the exercise reduced the biochemical parameters between groups DHSed/DHExe. Maternal exercise had an effect on future generations, being more evident in males, reducing adiposity as well as plasma glucose and triglyceride concentrations, and prevented prejudicial effects of glucose intolerance. Maternal overfeeding with Hypercaloric diet increased health risks both for mother and offspring, showing that HS/HF diet consumption promotes metabolic alterations in offspring, likely via epigenetic mechanisms. However, physical training performed by generation F0 proved to be protective against such effects.

Key-words: Obesity, Transgenerational obesity, Maternal Overfeeding, Physical training, Epigenetics

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AgRP</b>	Peptídeo Relacionado-agouti
<b>AMPK</b>	Proteína Quinase Ativada
<b>ARC</b>	Núcleo Arqueado
<b>CART</b>	Peptídeo Regulador da Transcrição de Cocaína e Anfetamina
<b>CpG</b>	Citosina – Fosfato- Guanina
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>DMH</b>	Núcleo Dorsomedial
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico
<b>DOHaD</b>	Developmental Origin of Health and Diseases
<b>GABA</b>	Ácido Aminobutírico Gama
<b>GLUT-4</b>	Proteína Transportadora de Glicose tipo 4
<b>HF/HS</b>	“High Fat/High Sugar”
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>MECP2</b>	“Methyl-CpG-binding protein 2”
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico - mensageiro
<b>NPY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma 1 alpha
<b>POMC</b>	Peptídeo Pro-opiomelanocortina
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>SM</b>	Síndrome Metabólica
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>STZ</b>	Streptozotocina
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	Hormônio Estimulador de Alpha-melanócito

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1 OBESIDADE COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA	14
2.2 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA COMO FATOR PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS	16
<b>2.2.1 Mecanismos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento da programação metabólica</b>	18
<b>2.2.2 A dieta como um modelo de programação metabólica</b>	20
<b>2.2.3 Efeitos transgeracionais da programação metabólica</b>	26
2.3 EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA DE REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA	28
<b>3.0 HIPÓTESE</b>	32
<b>4.0 OBJETIVOS</b>	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>4.2.1 Geração F0</b>	33
<b>4.2.2 Geração F1 (machos e fêmeas)</b>	33
<b>5.0 MATERIAL E MÉTODO</b>	34
5.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	34
5.2 DESENHO EXPERIMENTAL	34
<b>5.2.1 Geração F0</b>	34
<b>5.2.2 Protocolo de treinamento</b>	35
5.3 OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1	37
5.4 EUTANÁSIA	38
5.5 VARIÁVEIS OBSERVADAS	38
<b>5.5.1 Peso corporal e Identificação de obesidade visceral</b>	38
<b>5.5.2 Avaliação da tolerância oral a glicose (TOTG)</b>	38
<b>5.5.3 Avaliação Bioquímica</b>	39
5.6 GERAÇÃO F1	39
<b>5.6.1 Avaliação das crias( F1)</b>	40
5.6.1.1 Peso corporal e Identificação de obesidade visceral	40
5.6.1.2 Avaliação da tolerância oral a glicose (TOTG)	40
5.6.1.3 Avaliação Bioquímica	40
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
<b>6.0 RESULTADOS</b>	41
<b>7.0 CONCLUSÃO</b>	41
<b>8.0 REFERÊNCIAS</b>	42
<b>APÊNDICES</b>	51
<b>ANEXOS</b>	55

## 1.0 INTRODUÇÃO

A incidência de sobrepeso e obesidade vem aumentando ao longo das últimas décadas, este aumento reflete o surgimento das doenças associadas à obesidade na população em geral, porém vem apresentando taxas mais altas em mulheres do que em homens, como consequência, a porcentagem de obesidade em mulheres durante a gestação e em crianças ao nascimento tem aumentado enormemente. Há evidências em humanos e roedores que a obesidade materna é um grande fator de risco para o recém-nascido, comprometendo o metabolismo de glicose bem como outras mudanças no metabolismo que poderão lhe causar futura obesidade (BAE-GARTZ *et al.*, 2016a; WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009).

Estudos em animais, comparando diferentes modelos de indução de obesidade, indicaram que a superalimentação ou desnutrição materna e a superalimentação neonatal predis põem a ninhada à obesidade podendo prosseguir até a vida adulta e ser acompanhada de comorbidades como doenças cardiovasculares. Tanto a superalimentação quanto a subnutrição materna podem, através de mecanismos epigenéticos, acarretar ganho de peso corporal da cria desde o período neonatal até a vida adulta, causando alterações fisiológicas e metabólicas (WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009). Em modelo animal, um estudo avaliou o consumo materno de dieta hipercalórica e a saúde metabólica da prole, observou mudanças na saúde da prole, tais como aumento nas taxas de obesidade e percentual de gordura corporal, causando intolerância à glicose, aumento da proliferação de adipócitos e lipogênese, riscos de doenças cardiovasculares, diminuição da função de células beta pancreática e aumento do consumo alimentar (STANFORD *et al.*, 2015).

Estudos em humanos e animais têm mostrado severos efeitos metabólicos da superalimentação, destacando a necessidade de tratar ou prevenir esse problema (STANFORD *et al.*, 2015). Criar estratégias de prevenção efetivas é importante para diminuir essa epidemia e melhorar os parâmetros de saúde global (SHEN *et al.*, 2015).

O exercício físico é clinicamente comprovado como uma intervenção primária de baixo custo para o tratamento da obesidade e doenças crônicas relacionadas. É a primeira medida de prevenção e tratamento por se tratar de procedimento não farmacológico que atua no músculo esquelético aumentando a captação de glicose e no metabolismo lipídico, envolvendo o transporte, a captação, o catabolismo e o estoque de ácidos graxos (SHEN *et al.*, 2015).

Apesar do exercício na população em geral já ser bem conhecido e ter inúmeros benefícios para a saúde, o efeito do exercício materno no fenótipo metabólico da prole não é bem entendido (STANFORD *et al.*, 2015). Em modelos animais, alguns estudos mostram que o exercício materno melhora tolerância à glicose na ninhada controle e obesa (BAE-GARTZ *et al.*, 2016a).

Portanto, no presente estudo, utilizou-se o rato como modelo animal, para determinar os efeitos do treinamento físico materno e o consumo de ração rica em sacarose e lipídios na saúde metabólica da prole.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 OBESIDADE COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

Tanto a obesidade quanto o sobrepeso, anteriormente, eram associadas a países de alta renda; porém atualmente, prevalece em países de baixa e média renda. Em todo o mundo existem cerca de dois bilhões de adultos com sobrepeso dos quais 39% são homens e 40% mulheres. Enquanto que, aproximadamente, um milhão de adultos são obesos 11% homens e 15% mulheres (WHO, 2014). Sobrepeso e obesidade têm demonstrado aumentar com o passar das décadas, tornando-se um dos mais preocupantes problemas de saúde pública, pois pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem todo ano como resultado do sobrepeso ou obesidade (ENES; SLATER, 2010; WHO, 2014).

Estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado que o sobrepeso está relacionado ao aumento da morbidade e mortalidade em virtude de sua frequente associação com outras doenças que compõem a síndrome metabólica (SM) e, devido às patologias integrantes da SM o paciente estaria sob maior risco (SIMMONS, *et al.*, 2010).

O aumento do percentual de gordura corporal reflete alterações nas funções fisiológicas. A gordura visceral é a principal contribuinte para as alterações metabólicas devido à produção de adipocinas, que são citocinas presentes nos adipócitos, além disso, existe associação direta da obesidade com a atividade simpática e com a inflamação. Essa constatação desencadeou grande preocupação

em combater a obesidade, que é um fator de risco, *per se*, e que de certa forma contribui para a emergência de outros riscos (GÓMEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

A obesidade atualmente não atinge somente adultos, sendo também a obesidade infantil um dos grandes desafios de saúde pública do século 21. Crianças com sobrepeso são susceptíveis de se tornarem adultos obesos, além de serem mais propensos a desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares em uma idade mais jovem, aumentando o risco de morte precoce (CALI; CAPRIO, 2008; HERMAN *et al.*, 2009). Em 2013, mais de 42 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade estavam acima do peso, sendo que 31 milhões delas estão em países em desenvolvimento (WHO, 2013).

A etiologia da obesidade é multifatorial e vários fatores estão envolvidos no processo de desenvolvimento das desordens metabólicas, bem como fatores ambientais, metabólicos, genéticos, fisiológicos, comportamentais e sociais (BRAY; PAERATAKUL; POPKIN, 2004; PAES *et al.*, 2016) . O índice de massa corporal (IMC) é uma ferramenta utilizada para avaliar e classificar o indivíduo obeso de uma forma rápida e simples, utilizando-se o cálculo do peso corporal em quilogramas, dividido pela altura ao quadrado em metros. De acordo com o resultado o indivíduo pode ser classificado como portador de sobrepeso ou obesidade (Tabela 1). Entretanto, essa avaliação apresenta a limitação de não levar em consideração a massa de gordura corporal ou muscular.

Tabela 1: Classificação da Obesidade segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Classificação
< 18,5	Baixo peso
18,5 - 24,9	Peso normal
25,0 - 29,9	Sobrepeso
30,0 - 34,9	Obesidade Classe I
35,0 - 39,9	Obesidade Classe II
≥ 40	Obesidade Classe III

Tanto os fatores genéticos quanto nutricionais podem atuar como gatilho para o surgimento das disfunções fisiológicas, rompendo a homeostasia orgânica e desencadeando distúrbios metabólicos principalmente quando associados ao sedentarismo (HURT *et al.*, 2011). Desta forma, acredita-se que a interação desses fatores (genéticos e ambientais) possa modular o metabolismo energético.

## 2.2 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA COMO FATOR PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Programação metabólica é um conceito definido por um processo em que um insulto, ocorrido em período crítico de desenvolvimento, resulta em alterações permanentes, envolvendo vários sistemas e tecidos: sistema simpatoadrenal, cardiovascular, adiposo, hipotalâmico, entre outros; os quais mostram alterações muito bem delimitadas e que se relacionam com o metabolismo de reservas energéticas (ANDREAZZI, *et al.*, 2011; WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009; YAMADA-OBARA *et al.*, 2016). Lucas (1994), utilizou o termo programação para definir esses eventos ocorridos na vida precoce e que exercem efeitos em longo prazo.

Evidências demonstram que fatores ambientais, genéticos, entre outros, podem causar importantes efeitos epigenéticos, principalmente nos períodos de plasticidade neural como a gestação, infância e adolescência (BARKER, 1998). A programação metabólica durante esses períodos pode desencadear desordens fisiológicas, levando a comorbidades associadas à obesidade, como à síndrome metabólica (obesidade, diabetes, dislipidemias e hipertensão) e doenças cardiovasculares na idade adulta ( RYCKMAN; SMITH, 2015; ANZMAN; ROLLINS; BIRCH, 2010; VISSCHER; SEIDELL, 2001; BARKER, 1998; LUCAS, 1994; LUCAS, *et al.*, 1990) .

Estudos demonstraram que o peso no momento do nascimento bem como o tipo de dieta consumido pela mãe, tem relação direta com o surgimento de doenças cardiovasculares, hipertensão e desenvolvimento do Diabetes tipo 2 ( VASUDEVAN; RENFREW; MCGUIRE, 2011; BARKER, 1998;), do sistema imune e neuropsicomotor (LUCAS, *et al.*, 1990). Estes estudos levaram os autores a sugerirem o termo “programação” para explicar a relação existente entre estímulos precoces e consequências futuras. Lucas ainda mostrou que estímulos aplicados em fases cruciais do desenvolvimento neuronal (gestação, lactação, infância e adolescência) podiam produzir alterações persistentes (LUCAS, 1994). Essas alterações foram relacionadas com o surgimento de doenças futuras (JANSEN *et al.*, 2012), embasando assim, o termo DOHaD (*developmental origin of health and diseases*) ( WHINCUP *et al.*, 2008; BARKER, 1998). Outros estudos reforçam esse conceito, denominando-o de impressão metabólica, que se traduziria por modificação permanente de uma determinada função, conseqüente a alteração

nutricional, ocorrida em período crítico nos primeiros dias de vida (LEVIN, *et al.*, 2000; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; WATERLAND; GARZA, 1999).

### **2.2.1 Mecanismos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento da programação metabólica**

O mecanismo para explicar o desenvolvimento da programação metabólica relaciona-se a modificações epigenéticas, que regulam os padrões de expressão gênica. Alterações epigenéticas são estabelecidas durante o período fetal e estágios iniciais da vida pós natal (JAENISCH; BIRD, 2003). Essas alterações apresentam plasticidade do desenvolvimento em resposta ao ambiente uterino e são mantidas ao longo da vida. Assim sendo, perturbações de tais processos vem sendo consideradas o principal mecanismo pelo qual o estilo nutricional nos estágios iniciais do desenvolvimento possa induzir alterações fenotípicas, persistentes na vida adulta (GLUCKMAN *et al.*, 2009; STEVENS; BEGUM; WHITE, 2011; WATERLAND, ROBERT A., 2014).

Epigenética é o estudo que estabelece alterações na atividade gênica sem ocorrer mudanças na sequência de DNA. Modificações epigenéticas têm papel importante na regulação da cromatina, bem como da expressão gênica na diferenciação e desenvolvimento celular (DELAGE; DASHWOOD, 2008). Mais importante ainda, essas modificações epigenéticas funcionam sinergicamente para manter as conformações da cromatina de uma maneira específica do tipo celular para influenciar a atividade transcricional, relacionado ao tipo de alteração (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

Os distúrbios metabólicos desencadeados por condições intra-uterinas adversas são frequentemente acompanhados de alterações epigenéticas que referem-se às mudanças na estrutura bioquímica do DNA e que alteram a expressão gênica. Essas mudanças incluem, mas não estão limitadas a metilação do DNA, modificação das histonas e processos de RNA não codificantes (NISTALA *et al.*, 2011). A alteração epigenética do DNA de um indivíduo é herdada e modificável, de modo que os padrões de expressão podem ser passados de pais para gerações futuras, ou eles podem ser modificados em resposta a estímulos ambientais (WHITELAW; WHITELAW, 2006). Alterações epigenéticas foram observadas em associação com condições patológicas, oferecendo evidências bioquímicas dos efeitos deletérios que ocorrem durante o desenvolvimento fetal advindo dessas alterações e que podem permanecer até a vida adulta. Muito dessa relação de alteração epigenética e surgimento de patologias, são observados na síndrome metabólica e suas condições abrangentes, como obesidade e doenças cardiovasculares (HANSON; GLUCKMAN, 2014),

Um dos principais mecanismos responsáveis por tais alterações é a metilação do DNA. Sabe-se que a metilação de resíduos de citosina de 5' em regiões ricas em citosina / guanina (também conhecida como ilhas CpG) é uma modificação epigenética comum e a hipermetilação dessas regiões está associada à repressão transcricional. Essa repressão pode ser mediada por modificações nas histonas, nas quais as ilhas CpG hipermetiladas promovem a ligação do "Methyl-CpG-binding protein 2" (MECP2). O MECP2 se liga a citosinas metiladas no DNA, tanto para ativar quanto para reprimir a transcrição, com isso recrutam complexos

modificadores de histonas. A modificação das histonas resulta em uma estrutura de cromatina que é inacessível ao processo de transcrição (LILLYCROP, 2011).

Diante do exposto, epigenoma pode ser considerado como uma interface entre o genoma e o meio ambiente que é fundamental para a geração de fenótipos e sua estabilidade ao longo do curso de vida. Dado que as modificações epigenéticas são influenciadas por perturbações ambientais, vários estudos investigaram o efeito da nutrição materna nas mudanças epigenéticas dos genes chave que regulam o balanço energético e, assim, levando a distúrbios metabólicos, como obesidade, na prole.

Para entender melhor o papel da saúde materna e nutrição nos estágios iniciais do desenvolvimento fetal e progressão de doenças na infância e na idade adulta, é necessário identificar os papéis fisiológicos e / ou patológicos de nutrientes específicos bem como, possíveis intervenções dietéticas ainda na vida intra-uterina e vida pós natal, e como estes poderiam modular o risco de doença, através de alteração epigenômica.

### **2.2.2 A dieta como um modelo de programação metabólica**

A literatura claramente demonstra que insultos do meio ambiente durante períodos críticos do desenvolvimento fetal e estágios iniciais da vida pós natal pode influenciar nas vias de gasto energético com consequências metabólicas, como desenvolvimento de sobrepeso e obesidade, podendo essas perdurarem até a vida adulta (KWON; KIM, 2017; RAMAMOORTHY *et al.*, 2015). Uma explicação para tal

mecanismo é o tipo de nutrição, que pode interferir com a organogênese e alterar a estrutura e função dos órgãos (LANGLEY-EVANS, 2009).

Como citado anteriormente a relação entre o ambiente intra-uterino e a doença crônica na prole foi inicialmente observada em resposta à desnutrição materna. A hipótese é que, na presença de desnutrição materna, o metabolismo do desenvolvimento fetal é, estrutural e funcionalmente, alterado em antecipação de condições difíceis após o nascimento. Essa adaptação pode ter efeitos prejudiciais ainda maiores na prole quando o ambiente pós-natal é rico em nutrientes e não pobre em nutrientes (BURSZTYN; ARIEL, 2006).

Estudos experimentais têm investigado o efeito da dieta em ratas nos períodos críticos do desenvolvimento, como na gestação e na lactação, submetendo-as aos efeitos da desnutrição e dieta hipercalórica (HighFat/HighSugar)(HE *et al.*, 2009). Os ácidos graxos da dieta são conhecidos por influenciar a composição dos triglicerídeos armazenados e dos fosfolípidos das membranas celulares dos tecidos, além de acumularem-se nos tecidos fetais, pela capacidade de atravessar a placenta e leite materno (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004)

Curiosamente, a superalimentação durante a vida neonatal leva à hipermetilação no promotor do receptor de insulina hipotalâmico, envolvido na regulação da ingestão e metabolismo alimentar (PLAGEMANN *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que a alimentação de camundongos C57BL/6J com dieta rica em gordura durante a gravidez e a lactação resultou em hipometilação global e promotora da dopamina hipotalâmica e genes relacionados com opióides na prole, levando a uma maior expressão desses genes. Estes descendentes mostraram

maior preferência por alimentos saborosos, ricos em sacarose e gordura (VUCETIC *et al.*, 2010).

De fato, o enriquecimento dos fosfolipídeos nessas membranas, com ácidos graxos saturados, prejudica a ação da insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo por diminuírem a fluidez, e alterar bioquimicamente as propriedades e funcionalidade das proteínas membranares (CHECHI *et al.*, 2010). Em neonatos com contato direto com a dieta hipercalórica, o número absoluto de células dos órgãos pode estar aumentado ou diminuído e a proporção e distribuição de diferentes tipos de células nesses tecidos sofre alteração, levando a um desbalanço funcional, bem como alteração dos receptores hormonais, resultando em mecanismos de controle e *feedback* alterados (FALL, 2009; BARKER, 2004).

Dados da literatura, demonstraram que os filhotes de mães com obesidade e hiperglicemia tinham seis vezes mais chances de apresentarem resistência à insulina em relação aos controles. Além disso, apresentaram cerca de 20% a mais de gordura corporal, IMC e pressão arterial mais elevados. Essas alterações eram detectáveis já no início da vida, e observaram que a longo prazo, a prevalência de obesidade também foi maior no grupo cujas mães apresentavam excesso de glicose circulante (BUCKLEY *et al.*, 2005; GIRAUDO *et al.*, 2010; SIMEONI *et al.*, 2009)

Esses achados sugerem que a modulação da dieta durante os estágios críticos do período de crescimento também pode afetar a regulação epigenética de genes envolvidos na ingestão de alimentos, peso corporal e homeostasia energética, com conseqüente risco de desenvolver obesidade e distúrbios relacionados. Uma programação inadequada pode comprometer a correta estocagem e utilização das

reservas energéticas, colaborando para o acúmulo de peso e doenças relacionadas com o passar dos anos (DRAGANSKI; MAY, 2008; MICHELINI, 2007).

O que esses estudos nos mostram é a importância de considerar a nutrição materna como um dos principais fatores para alterações epigenéticas na prole, uma vez que o mecanismo de controle entre a ingestão alimentar (controle de fome/saciedade) e gasto energético, é exercido por áreas do sistema nervoso central, principalmente no hipotálamo, onde estão localizados os principais neurônios que desempenham esse papel.

Nesse contexto, experiências nutricionais alteradas durante a vida fetal ou pós-natal influenciam o estado epigenético dos genes hipotalâmicos fundamentais envolvidos no balanço energético. Mahmood *et al.* (2013) mostraram que a alimentação de ratos recém-nascidos com leite com fórmula de alto teor de carboidratos resultou em aumento da expressão de mRNA de neuropeptídeo Y (NPY). Isto correlacionou-se com alterações epigenéticas como hipometilação de locais CpG específicos e aumento da acetilação na região promotora proximal de NPY e foi associada à obesidade adulta.

Sabe-se que o balanço energético é controlado pelo sistema nervoso central (SNC), predominantemente pelo hipotálamo. A principal área hipotalâmica desse controle é o núcleo arqueado (ARC), mas também tem ação o núcleo paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH). O núcleo arqueado é conhecido como controle central da alimentação no cérebro, essa região é próxima ao terceiro ventrículo e eminência medial. O ARC contém neurônios anorexígenos e orexígenos, que liberam peptídeos

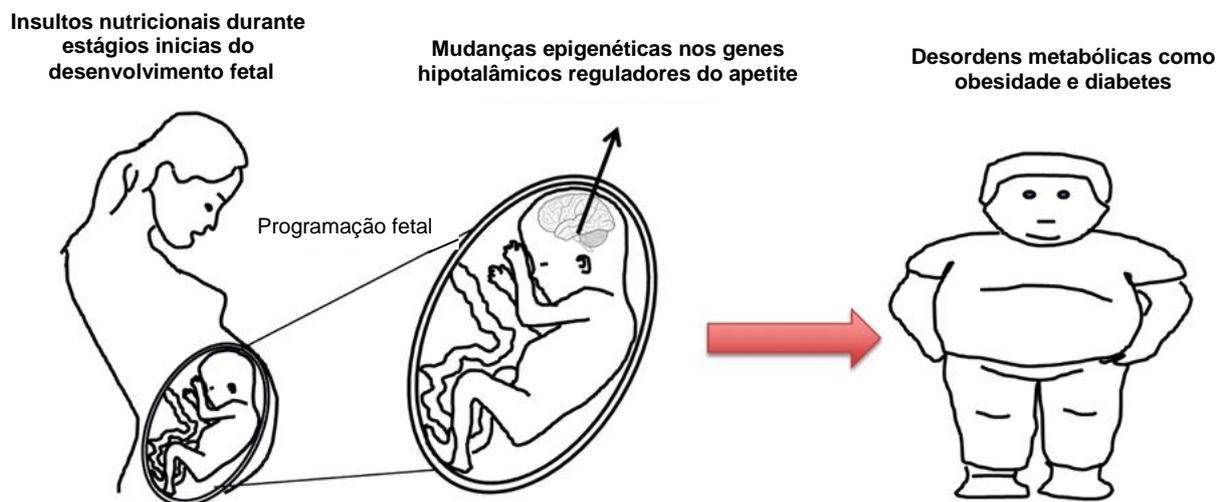
para contrabalancear o controle da fome/saciedade e gasto energético (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

O neuropeptídeo anorexígeno mais estudado é pro-opiomelanocortina (POMC) e peptídeo regulador da transcrição de cocaína e anfetamina (CART), ambos estão associados ao controle do balanço energético. Já em relação ao controle do consumo alimentar os neurônios orexígenos mais relevantes estão no ARC e primeiramente liberam o neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado-agouti (AgRP) e o ácido aminobutírico gama (GABA) (KARATSOREOS *et al.*, 2010; RAMAMOORTHY *et al.*, 2015). O papel desses neurônios no controle do consumo alimentar tem sido evidenciado em estudos recentes onde um dos neurônios foi deletado, e esse estudo demonstrou que NPY, AgRP e GABA têm papel sinérgico no controle do consumo alimentar (KRASHES *et al.*, 2013). Contudo em outro estudo onde se removeu por completo os neurônios anorexígenos do ARC, levou o animal a fome, indicando o papel essencial desses neurônios na regulação do apetite (GROPP *et al.*, 2005; LUQUET *et al.*, 2005).

Outros modelos de indução de obesidade como os estudos em modelo de diabetes gestacional em roedores, induzida por streptozotocina (STZ) durante estágios iniciais da gestação, avaliaram os filhotes e o sistema de regulação hipotalâmica do apetite. Esses filhotes apresentaram alterações metabólicas, como aumento de glicose e insulina plasmáticas, hiperfagia e ganho de peso corporal. Além disso, os animais apresentaram alterações estruturais hipotalâmicas no núcleo paraventricular afetando a densidade de AgRP e hormônio estimulador de alfa-

melanócito ( $\alpha$ -MSH) que é um hormônio liberado na quebra do POMC nas fibras levando a alterações na sensibilidade a leptina (STECULORUM; BOURET, 2011).

Em um modelo similar, Plagemam *et al.* (1999) demonstraram que filhotes provenientes de mães diabéticas tiveram aumento de neurônios contendo NPY. Esses estudos mostram que a diabetes gestacional leva a má programação do sistema hipotalâmico anorexígeno e orexígeno nos filhotes, contribuindo para alterações metabólicas na vida adulta. Essas alterações hipotalâmicas na regulação do apetite podem ser prevenidas normalizando a hiperglicemia gestacional (Figura 1) (FRANKE *et al.*, 2005; PLAGEMANN *et al.*, 1999), e um dos mecanismos poderia ser a prática de exercícios físicos.



**Figura 1- Adaptado de RAMAMOORTHY et al., 2015, Programação epigenética da obesidade:** Alterações nutricionais durante os períodos críticos do desenvolvimento fetal, podem programar alterações epigenéticas no sistema hipotalâmico regulatório do apetite, que podem levar a mudanças nos padrões de expressão gênica e aumentar a susceptibilidade a distúrbios metabólicos como obesidade e diabetes.

### 2.2.3 Efeitos transgeracionais da programação metabólica

Evidências de estudos em humanos e animais indicam que a programação do desenvolvimento da obesidade e outros distúrbios metabólicos é um fenômeno transgeracional e a transmissão de efeitos para as gerações subsequentes pode ocorrer mesmo na ausência de exposição a condições adversas (AIKEN; OZANNE, 2014). Embora os mecanismos subjacentes à transmissão transgeracional da programação não sejam claros, a evidência mostra que isso pode ser devido à herança epigenética através das linhagens maternas e paternas (AIKEN; OZANNE, 2014; TAIT *et al.*, 2015).

O envolvimento de mecanismos epigenéticos na ampliação transgeracional da obesidade foi mostrado em estudo, onde a suplementação de doador de metil (por exemplo, ácido fólico) durante o desenvolvimento impediu o aumento do peso corporal nas gerações subsequentes, causadas pela obesidade materna (WATERLAND, R. A. *et al.*, 2008). Outros estudos utilizando modelos animais demonstraram efeitos transgeracionais da sobrenutrição materna sobre o metabolismo da glicose (GNIULI *et al.*, 2008; JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2008) e função de eixo cardiovascular em descendentes F2 (BERTRAM *et al.*, 2008).

Pesquisas que envolvem alterações nos estágios iniciais do desenvolvimento e a regulação metabólica ao longo da vida tem aumentado desde o trabalho de Hales e Barker (1992) no início dos anos 90. Com base em evidências epidemiológicas convincentes, eles encontraram forte associação entre a

desnutrição fetal e neonatal e uma série de condições metabólicas crônicas na vida adulta, incluindo doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes. Eles propuseram que uma nutrição fraca durante o desenvolvimento perinatal provoca um "fenótipo poupador", em que o indivíduo se adapta a um ambiente com pequeno suprimento de alimentos, apresentando deficiências no crescimento, com menor taxa metabólica e mostrando menor atividade comportamental a fim de economizar energia. A Teoria de Barker explicava que esses indivíduos quando expostos a um ambiente mais rico em nutrientes, poderiam correr um risco maior de desenvolver obesidade e diabetes tipo 2 devido a incompatibilidade entre o ambiente nutricional real e esperado.

A partir desses estudos o conceito de programação perinatal de obesidade e diabetes foi então ampliado para outros insultos nutricionais, incluindo a supernutrição materna e/ou pós-natal. Demonstrando que mudanças no ambiente perinatal podem afetar a estrutura e a função dos principais órgãos metabólicos relevantes, como o pâncreas, fígado e tecido adiposo. Há também uma crescente linha de estudos mostrando que a programação do desenvolvimento de sistemas neurais envolvidos no equilíbrio energético pelo meio perinatal representa uma possível causa de obesidade e diabetes (HALES E BARKER. 1992).

No entanto, o efeito sobre a regulação do apetite nas gerações subsequentes não foi amplamente estudado e, portanto, requer investigação mais aprofundada pois, a compreensão dos mecanismos de herança transgeracional é importante para o desenvolvimento de estratégias de intervenção para modular os efeitos da programação metabólica nos descendentes.

### 2.3 EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA DE REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Uma forma não medicamentosa para o combate de desordens metabólicas é a prática regular de exercício físico. Há relatos na literatura que associam a prevenção e o tratamento da obesidade e distúrbios metabólicos, através de reeducação alimentar e exercício físico e, mesmo sem alterações de peso corporal o treinamento físico traz muitos benefícios para o funcionamento do organismo (CARTER *et al.*, 2012; BARBALHO *et al.*, 2011).

Cada vez mais estudos sugerem que o exercício físico seja uma potente ferramenta, não farmacológica, como forma de se reverter a má programação metabólica, sendo um dos benefícios à redução da glicemia em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (CARTER *et al.*, 2012). A realização de exercícios contribui também para uma remodelação neural que promove desenvolvimento cognitivo, melhora do aprendizado, regulação dos centros de apetite e saciedade (DRAGANSKI; MAY, 2008).

Kern *et al.* (1990) em pesquisa com ratos relataram que o treinamento físico teve efeito benéfico, aumentando a ação periférica da insulina e melhorando a resistência causada por dieta rica em gordura, já que em indivíduos obesos e diabéticos tipo 2, a captação de glicose está comprometida, devido à marcante resistência à insulina. O treinamento físico também é capaz de aumentar a captação de glicose e síntese de glicogênio em músculo esquelético de ratos, alimentados com dieta rica em gordura (KERN *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2000), pois durante a

contração muscular ocorre aumento da taxa de captação de glicose pelo músculo (RÖCKL; WITCZAK; GOODYEAR, 2008).

O mecanismo responsável por tal processo durante o treinamento físico é a via insulina independente, onde a captação de glicose, ocorre por meio da translocação do GLUT-4 (proteína transportadora de glicose) na membrana do músculo esquelético, promovendo entrada de glicose para a célula muscular e assim, a normalização da glicemia. A contração muscular aumenta a taxa de transcrição e translocação do GLUT4 mediado pela AMPK (Proteína Quinase Ativada), por este motivo, o exercício é considerado como uma ferramenta potente, não farmacológica, para tratamento da obesidade e principalmente do DM2 (CARTER *et al.*, 2012; O'NEILL *et al.*, 2011). Sugere-se que o exercício físico restaure a quantidade de GLUT4 de indivíduos diabéticos, o que favorece maior controle da glicemia (CHRIST-ROBERTS *et al.*, 2004).

O exercício físico é capaz de reduzir os lipídeos plasmáticos e a gordura corporal, bem como as concentrações séricas de leptina, visto que esta se relaciona diretamente com a massa de tecido adiposo (HONGU; SACHAN, 2000). O exercício físico melhora a sensibilidade à leptina no hipotálamo, podendo ter ligação direta com a normalização do consumo alimentar (FLORES *et al.*, 2006). Além disso, a prática do exercício físico tem efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, diminuindo a pressão arterial e a resistência vascular, parecendo agir sobre os sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina (FAGARD, CORNELISSEN, 2007; DE ANGELIS *et al.*, 2004).

Estudos relacionando a programação metabólica e exercício físico têm demonstrado resultados positivos na saúde da prole. Wojtyla *et al.* (2012) observou que mães que se exercitam durante a vida toda, inclusive na gestação, podem influenciar de forma considerável o desenvolvimento de seus filhos. Bae-Gartz *et al.* (2016) demonstrou que o exercício materno, em camundongo obeso, pode ser um dos mecanismos subjacentes para a melhoria do metabolismo da glicose na prole, independente do peso corporal. Assim, o exercício durante a gestação pode ser um componente crucial para promover e programar a saúde metabólica da prole (BAE-GARTZ *et al.*, 2016b; WOJTYŁA *et al.*, 2012).

Além dos benefícios do exercício já conhecidos, existem benefícios na alteração de expressão gênica. Uma das explicações ligadas à capacidade de reprogramação epigenética do exercício é que a prática regular é capaz de promover, entre outros fatores, a metilação de genes envolvidos na biogênese mitocondrial, que são ativados pela liberação de fatores celulares transcricionais pelo músculo esquelético, principalmente de PGC-1 $\alpha$  (Coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma 1 alpha). Sua atividade molecular está diretamente associada à otimização da capacidade oxidativa do tecido adiposo, ou seja, o aumento da expressão muscular da PGC-1 é capaz de aumentar a capacidade metabólica e, assim, aumentar o gasto de energia do tecido adiposo (BARRÈS *et al.*, 2012; CHAN; ARANY, 2014).

Indivíduos que se exercitam diariamente têm níveis significativamente aumentados de metilação do DNA genômico em comparação com aqueles de baixa atividade física diária (ZHANG; CLINE; GILBERT, 2014). Laker *et al.* (2014)

demonstraram que o exercício antes e durante a gravidez foi capaz de aumentar a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  e proteger a prole contra os distúrbios metabólicos associados ao consumo materno de dietas ricas em gordura.

Curiosamente, o estado de metilação do promotor desse gene em particular é aumentado de forma coordenada no músculo esquelético de indivíduos com diabetes tipo 2 (BARRÈS *et al.*, 2009), sugerindo relação entre transcrição de tais genes e estado da saúde metabólica. Laker *et al.* (2014) demonstraram que as rápidas modificações epigenéticas "adaptativas" desencadeada por perturbações fisiológicas, podem fornecer um mecanismo molecular para aumentar a sensibilidade insulínica do músculo esquelético. Assim, a metilação do promotor PGC-1a no músculo esquelético é uma modificação epigenética com importantes consequências relevantes para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (KIRCHNER *et al.*, 2013; LAKER *et al.*, 2014).

Portanto, acredita-se que o exercício físico em diferentes estágios da vida e, mesmo antes da concepção, realizado pelas fêmeas pode atuar como agente de reprogramação metabólica ambiental para respostas metabólicas, estimuladas nas fases iniciais da vida. Diante do exposto, ficou claro que o exercício físico é um importante componente no estilo de vida saudável, contudo mais estudos ainda se fazem necessários para estabelecer os mecanismos epigenéticos dos benefícios do exercício materno antes e/ou durante a gravidez e as consequências a longo prazo sobre a descendência.

### **3.0HIPÓTESE**

O treinamento físico de intensidade moderada a intensa, realizado pela geração F0, protege o metabolismo da prole contra os efeitos prejudiciais da programação metabólica induzida por alimentação materna rica em carboidratos simples e lipídios.

## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o treinamento físico em fêmeas alimentadas por dieta rica em carboidratos simples e lipídios pode reverter ou atenuar a programação metabólica que causa adiposidade e alterações metabólicas na prole.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **4.2.1 Geração F0**

- Induzir o modelo de sobrepeso/obesidade através de dieta rica em carboidratos simples e lipídeos durante toda a vida desde o desmame;
- Melhorar as consequências da dieta através do protocolo de exercício físico em longo prazo.

#### **4.2.2 Geração F1 (machos e fêmeas)**

- Avaliar se os filhotes tiveram alterações na vida adulta em consequência do ambiente nutricional materno;
- Avaliar se o treinamento físico em longo prazo realizado pelas mães antes da gestação foi eficiente em reverter as consequências da programação metabólica.

## 5.0 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo 067/2013).

### 5.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas Ratas Wistar (n=40) recém desmamadas com vinte e um dias de vida (F0) e peso médio de 25 – 35 gramas, fornecidas pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (CIAEP nº 01.0048.2013). Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com quatro animais por gaiola, com livre acesso a ração e água filtrada não esterilizada. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados com controle de fluxo de ar, em alojamentos com temperatura constante ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $60 \pm 10\%$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 6 horas da manhã e concluída às 18 horas.

### 5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 5.2.1 Geração F0

As fêmeas da geração F0 (n=40) foram distribuídas em quatro grupos: controle sedentário (CSed/n=10), controle exercitado (CEEx/n=10), dieta hipercalórica sedentário (DHSed/n=10) e dieta hipercalórica exercitado (DHEEx/n=10). O grupo

controle recebeu ração padrão comercial Nuvital<sup>®</sup> (Nuvilab CR-1, Colombo-PR, Brasil) contendo 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 5% de celulose e 4,5% de vitaminas e minerais, fornecendo 3,2 Kcal/kg de ração, considerada normocalórica, e o grupo dieta hipercalórica recebeu ração peletizada rica em sacarose e lipídios, tendo como composição 19,17% de proteína, 35,73% de carboidratos sendo 22% sacarose e 45,10% de lipídeos, fornecendo 4.590 kcal/Kg de acordo com o protocolo de Park e colaboradores (1999), pré-fabricada pela empresa PragSoluções Comércio e Serviços Ltda@, Jaú-SP, Brasil. Os grupos receberam as dietas específicas desde os 21 até os 120 dias de vida, sendo mantidas durante o período de gestação e lactação (PARK *et al.*, 1999).

### **5.2.2 Protocolo de treinamento**

O treinamento físico foi realizado seguindo o protocolo de exercício elaborado pelo nosso grupo (Quadro 1), baseado no protocolo de Negrão *et al.* (1992). O protocolo de treinamento consistiu de corrida em esteira automatizada, com seis baias (Insight<sup>®</sup>) com inclinação de 5 Graus (Negrão *et al.*, 1992).

Os animais do grupo exercitado, começaram o treinamento em esteira aos 21 dias de vida e as duas primeiras semanas foram de adaptação com velocidade inicial de 10 m/min e com duração de 10 minutos, evoluindo para 20 minutos e velocidade de 12 m/min. Após o período de adaptação, iniciaram-se as sessões de treinamento que ocorreram três vezes por semana, em velocidade de 12 m/min. e duração de 20 minutos. O treinamento foi mantido até os 120 dias de vida das fêmeas, que terminaram as sessões de

treinamento com velocidade de 23 m/min. e duração de 75 minutos, conforme mostrado no quadro 1.

**Quadro 1:** Protocolo de treinamento físico adaptado, utilizado durante o experimento.

Sessão	Velocidade	Tempo
1ª sessão (adaptação)	10 m/min	10 min
2ª sessão (adaptação)	10 m/min	12 min
3ª sessão (adaptação)	10 m/min	15 min
4ª sessão (adaptação)	12 m/min	15 min
5ª sessão (adaptação)	12 m/min	17 min
6ª sessão	12 m/min	20 min
7ª sessão	12 m/min	20 min
8ª sessão	13 m/min	22 min
9ª sessão	13 m/min	25 min
10ª sessão	13 m/min	25 min
11ª sessão [45 dias de vida]	14 m/min	27 min
12ª sessão	14 m/min	30 min
13ª sessão	14 m/min	30 min
14ª sessão	15 m/min	32 min
15ª sessão	15 m/min	35 min
16ª sessão	15 m/min	35 min
17ª sessão	16 m/min	37 min
18ª sessão [60 dias de vida]	16 m/min	40 min
19ª sessão	16 m/min	40 min
20ª sessão	17 m/min	42 min
21ª sessão	17 m/min	45 min
22ª sessão	17 m/min	45 min
23ª sessão	18 m/min	47 min
24ª sessão [75 dias de vida]	18 m/min	50 min
25ª sessão	18 m/min	50 min
26ª sessão	19 m/min	52 min
27ª sessão	19 m/min	55 min
28ª sessão	19 m/min	60 min
29ª sessão	20 m/min	60 min
30ª sessão [90 dias de vida]	20 m/min	60 min
31ª sessão	20 m/min	62 min
32ª sessão	21 m/min	65 min
33ª sessão	21 m/min	65 min
34ª sessão	21 m/min	67 min
35ª sessão	22 m/min	70 min
36ª sessão	22 m/min	70 min
37ª sessão	22 m/min	72 min
38ª sessão	23 m/min	75 min
39ª sessão [120 dias de vida]	23 m/min	75 min

Os animais de ambos os grupos, sedentários e exercitados, realizaram também três testes de esforço para determinação do  $VO_{2máx.}$  com auxílio de um analisador de gases Havard Aparatus® e esteira individual própria para roedores (Panlab®), com inclinação de 5 graus. O  $VO_{2máx.}$  foi considerado como o valor alcançado quando, mesmo diante do aumento da carga, não ocorresse aumento de  $\pm 5\%$  no consumo de  $O_2$ . O primeiro teste foi realizado com 36 dias, logo após a adaptação, o segundo teste aos 80 dias e o último com 120 dias, seguindo o protocolo de esforço máximo. O protocolo de esforço iniciava com velocidade de 10 m/min, e a cada intervalo de 3 minutos era acrescido 1 m/min. O ponto de fadiga foi determinado a partir do momento que o animal não conseguia manter o ritmo exigido pelo estágio do teste e se mantinha na grade de estímulos, ao detectar-se essa condição, a grade de estímulos era imediatamente desligada e o animal removido da esteira (SOARES *et al.*, 2004).

### 5.3 OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F1

Após 120 dias de vida das fêmeas da geração F0 (n=40), foi verificado o ciclo estral de todos os grupos, através de esfregaço vaginal, realizado através de lavado vaginal com pipeta e água filtrada. A secreção coletada foi analisada em microscópio óptico, para determinar a fase do ciclo estral em que o animal se encontrava.

As fêmeas em fase de proestro foram alocadas em gaiolas na razão de três fêmeas e um macho. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, realizado na manhã seguinte ao acasalamento, foi considerada indicativo de possível prenhes do animal. Próximo à data provável do parto (20º dia pós-inseminação) as ratas foram alocadas em caixas individuais para a construção do

ninho e parir a ninhada para formar a próxima geração (F1). A dieta hipercalórica foi mantida durante a gestação e lactação.

#### 5.4 EUTANÁSIA

Após o desmame dos filhotes (Geração F1) as fêmeas foram eutanasiadas por aprofundamento de anestesia, cetamina (180 mg/kg ip.) e xilazina (10 mg/kg ip.) (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina), seguida de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado e o soro armazenado a -80°C para análises futuras.

#### 5.5 VARIÁVEIS OBSERVADAS

##### **5.5.1 Peso corporal e Identificação de obesidade visceral**

A evolução do peso corporal dos animais foi registrado uma vez por semana até o desmame da prole. Utilizamos como medida do acúmulo visceral e gordura o peso relativo (%) do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, obtidos por lipectomia abdominal bilateral, realizada após eutanásia, ao final do experimento.

##### **5.5.2 Avaliação da tolerância à glicose (TOTG)**

Os testes foram realizados no período da tarde, após jejum diurno de 6/8 horas. Os animais foram alocados individualmente para o teste e foi coletada uma gota de sangue após secção mínima da cauda, para mensuração da glicemia basal T<sub>0</sub> (Tempo zero). Todas as alíquotas tiveram suas glicemias mensuradas utilizando-

se fitas reativas (Roche®) e aparato de leitura das fitas (Accu-chek Active Roche®, Mannheim, Alemanha).

Para o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), após a mensuração da glicemia basal  $T_0$ , foi ministrado 2g/kg de peso corporal de solução de glicose a 50%, via gavagem, coletando-se a partir de então amostras de sangue nos tempos  $T_1$  (15min),  $T_2$  (30 min),  $T_3$  (60 min) e  $T_4$  (120min). Posteriormente calculou-se a área sob a curva.

### **5.5.3 Avaliação Bioquímica**

Os níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol total e frações HDL e LDL, foram avaliados após 8 horas de jejum, em aparelho automático COBAS MIRA PLUS Roche®, utilizando kits comerciais (COBAS, Roche®) específicos do aparelho.

## **5.6 GERAÇÃO F1**

Após o desmame dos animais aos 21 dias de vida, os filhotes machos e fêmeas da geração F1 e F2 (n=80) foram pesados e separados em quatro grupos de acordo com o grupo materno (F0) ao qual pertenciam: controle sedentário (CSed1/n=20), controle exercitado (CEx1/n=20), dieta hipercalórica sedentário (DHSed1/n=20) e dieta hipercalórica exercitado (DHEx1/n=20). Todos os animais da geração F1 receberam ração padrão (ração Nuvital®, Curitiba, Brasil) e não foram exercitados.

Aos 80 dias os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (PELLOW *et al.*,1985). Aos 90 dias de vida, depois da realização de todos os testes, os machos (n=40) e fêmeas (n=40) foram eutanasiados por exsanguinação total, seguida de ruptura do diafragma sob anestesia, cetamina (90 mg/kg ip.) e xilazina (10 mg/kg ip.) (König SA®, Avellaneda, Argentina)

### **5.6.1 Avaliação das crias( F1)**

#### 5.6.1.1 Peso corporal e Identificação de obesidade visceral

O peso corporal dos animais foi registrado ao final do experimento, ao completar 90 dias. Utilizamos como medida do acúmulo visceral e gordura o peso relativo (%) do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal obtidos por lipectomia abdominal bilateral, realizada após eutanásia, ao final do experimento.

#### 5.6.1.2 Avaliação da tolerância oral a glicose (TOTG)

O teste de tolerância oral a glicose e a glicemia sérica foram avaliadas conforme descrito no item 5.5.2.

#### 5.6.1.3 Avaliação Bioquímica

Os níveis séricos de glicose, triglicérides e colesterol total, HDL e LDL foram avaliados, conforme descrito no item 5.5.3.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram comparados através da análise de variância (ANOVA ONE WAY) e pós-teste de Tukey, para comparação entre os grupos, considerando os fatores programação e treinamento físico. Considerou-se significativa a diferença entre grupos quando  $p < 0,05\%$ . Foi utilizado o programa estatístico *Graph Pad Prisma for Windows*<sup>®</sup> versão 5.0.

## 6.0 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigo de acordo com o regimento do programa de pós-graduação em saúde.

O trabalho resultou em artigo de revisão publicado na *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* (Qualis B1) (Apêndice A), resumo apresentado em eventos científicos (Apêndice B) e dois artigos que foram submetidos a revistas internacionais (Apêndice C e D).

## 7.0 CONCLUSÃO

Em conclusão, a obesidade materna em ratos, durante a gravidez, aumentou os riscos para a saúde tanto da mãe quanto da prole, induzindo aumento do peso corporal, adiposidade, hiperglicemia e prejuízo do perfil lipídico. O treinamento físico leve a moderado realizado por grupo dieta hipercalórica F0 (DHExe), antes da gestação, teve benefícios na normalização de suas concentrações de glicose, triglicérides e colesterol no sangue. O treinamento físico materno parece ter efeitos

benéficos para limitar o impacto da programação metabólica materna na prole, reduzindo, a adiposidade bem como as concentrações plasmáticas de glicose e lipídios.

Apesar do consumo de dieta rica em sacarose e lipídios em indivíduos de idade reprodutiva ser capaz de transmitir o risco para as gerações subsequentes, através de mecanismos epigenéticos, os resultados do presente trabalho sugerem ser possível reverter tais riscos através do treinamento físico crônico, tanto nas mães quanto na prole. Porém estudos adicionais em nível molecular e genético são recomendados para aumentar a compreensão dos mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos do treinamento físico nas gerações seguintes.

## 8.0 REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M *et al.* Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. **Cell Death and Differentiation** v. 23, n. 9, p. 1502–1514 , 2016.

AIKEN, Catherine E.; OZANNE, Susan E. Transgenerational developmental programming. **Human Reproduction Update** v. 20, n. 1, p. 63–75 , 2014.

ALBUQUERQUE, Kelse T *et al.* Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)** v. 22, n. 7–8, p. 820–9 , 2004.

ANDREAZZI, A. E. *et al.* Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology** , 2009.

ANDREAZZI, Ana Eliza *et al.* Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. **Experimental Diabetes Research** v. 2011 , 2011.

ANZMAN, S L; ROLLINS, B Y; BIRCH, L L. Parental influence on children's early eating environments and obesity risk: implications for prevention. **Int J Obes (Lond)** v. 34 , 2010.

- ARMITAGE, James A *et al.* Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **The Journal of Physiology** v. 561, n. 2, p. 355–377 , 2004.
- BAE-GARTZ, Inga *et al.* Running exercise in obese pregnancies prevents IL-6 trans-signaling in male offspring. **Medicine and Science in Sports and Exercise** v. 48, n. 5, p. 829–838 , 2016a.
- BAE-GARTZ, Inga *et al.* Running exercise in obese pregnancies prevents IL-6 trans-signaling in male offspring. **Medicine and Science in Sports and Exercise** , 2016b.
- BARBALHO, Sandra Maria *et al.* Efeito do exercício físico contínuo e intervalado no peso e perfil bioquímico de ratas Wistar prenhes e consequências no peso da prole. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** v. 17, n. 6, p. 413–415 , Dec. 2011.
- BARKER, D.J.P. The Developmental Origins of Adult Disease. **Journal of the American College of Nutrition** v. 23, n. sup6, p. 588S–595S , Dec. 2004.
- BARKER, D J P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science** v. 95, n. 2, p. 115 LP-128 , 1 Aug. 1998.
- BARRÈS, Romain *et al.* Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. **Cell Metabolism** v. 15, n. 3, p. 405–411 , 2012.
- BARRÈS, Romain *et al.* Non-CpG Methylation of the PGC-1 $\alpha$  Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. **Cell Metabolism** v. 10, n. 3, p. 189–198 , 2009.
- BERTRAM, Caroline *et al.* Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. **Journal of Physiology** v. 586, n. 8, p. 2217–2229 , 2008.
- BRAY, George A.; PAERATAKUL, Sahasporn; POPKIN, Barry M. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. **Physiology & Behavior** v. 83, n. 4, p. 549–555 , Dec. 2004.
- BUCKLEY, Alexandra J. *et al.* Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental** , 2005.
- BURDGE, Graham C *et al.* Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **British Journal of Nutrition** v. 97, n. 6, p. 1036–1046 , 2007.
- BURSZTYN, Michael; ARIEL, Ilana. Maternal-fetal deprivation and the cardiometabolic syndrome. **Journal of the cardiometabolic syndrome** v. 1, n. 2, p. 141–145 , 2006.
- CALI, Anna M G; CAPRIO, Sonia. Obesity in Children and Adolescents. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 93, n. 11\_supplement\_1, p. s31–s36 , 2008.
- CARTER, Lindsay G *et al.* Perinatal exercise improves glucose homeostasis in adult offspring. **AJP: Endocrinology and Metabolism** v. 303, n. 8, p. E1061–E1068 , 2012.
- CHAN, Mun Chun; ARANY, Zolt. The many roles of PGC-1 $\alpha$  in muscle - Recent developments. **Metabolism: Clinical and Experimental** v. 63, n. 4, p. 441–451 , 2014.

CHECHI, Kanta *et al.* Maternal dietary fat intake during gestation and lactation alters tissue fatty acid composition in the adult offspring of C57Bl/6 mice. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids** v. 83, n. 2, p. 97–104 , Aug. 2010.

CHEONG, Jean N. *et al.* Programming of maternal and offspring disease: impact of growth restriction, fetal sex and transmission across generations. **The Journal of Physiology** v. 594, n. 17, p. 4727–4740 , 2016.

CHRIST-ROBERTS, Christine Y *et al.* Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism: clinical and experimental** v. 53, n. 9, p. 1233–42 , Sep. 2004.

DE ANGELIS, K *et al.* Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)** v. 96, n. 6, p. 2174–2178 , 2004.

DELAGE, Barbara; DASHWOOD, Roderick H. NIH Public Access. **Annu Rev Nutr** v. 28, p. 347–366 , 2008.

DISHMAN, Rod K. *et al.* Neurobiology of Exercise\*. **Obesity** v. 14, n. 3, p. 345–356 , 2006.

DRAGANSKI, B.; MAY, A. Training-induced structural changes in the adult human brain. **Behavioural Brain Research** v. 192, n. 1, p. 137–142 , Sep. 2008.

EISELE, Petra S.; HANDSCHIN, Christoph. Functional crosstalk of PGC-1 coactivators and inflammation in skeletal muscle pathophysiology. **Seminars in Immunopathology** v. 36, n. 1, p. 27–53 , 2014.

EL-ASSAAD, Wissal *et al.* Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic  $\beta$ -cell death. **Endocrinology** v. 144, n. 9, p. 4154–4163 , 2003.

ENES, Carla Cristina; SLATER, Betzabeth. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 13, n. 1, p. 163–171 , Mar. 2010.

FALL, Caroline. Maternal nutrition: Effects on health in the next generation. **Indian Journal of Medical Research** v. 130, n. 5, p. 593–599 , 2009.

FLORES, Marcelo B S *et al.* Exercise Improves Insulin and Leptin Sensitivity in Hypothalamus of Wistar Rats. **Diabetes** v. 55, n. 9, p. 2554 LP-2561 , 25 Aug. 2006.

FRANKE, Kerstin *et al.* “Programming” of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. **Brain Research** v. 1031, n. 2, p. 276–283 , 2005.

GIRAUDO, Silvia Q. *et al.* Maternal high fat feeding and gestational dietary restriction: Effects on offspring body weight, food intake and hypothalamic gene expression over three generations in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 97, n. 1, p. 121–129 , Nov. 2010.

GLUCKMAN, Peter D. *et al.* Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nature Reviews Endocrinology** v. 5, n. 7, p. 401–408 , 2009.

GNIULI, Donatella *et al.* Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. **Journal of Lipid Research** v. 49, n. 9, p. 1936–1945 , 2008.

- GOMES, Rodrigo Mello *et al.* Efeito de um programa de exerc??cio f??sico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade. **Revista da Educacao Fisica** v. 23, n. 2, p. 285–294 , 2012.
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ, Almudena *et al.* Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **International Journal of Endocrinology** v. 2016, p. 1–14 , 2016.
- GRECO, L; POWER, C; PECKHAM, C. Adult outcome of normal children who are short or underweight at age 7 years. **BMJ** v. 310 , 1995.
- GROPP, Eva *et al.* Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nature Neuroscience** v. 8, n. 10, p. 1289–1291 , 2005.
- GUINHOUYA, Benjamin C. Physical activity in the prevention of childhood obesity. **Paediatric and Perinatal Epidemiology** v. 26, n. 5, p. 438–447 , 2012.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia** v. 35, p. 595–601 , 1992.
- HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? **Physiological Reviews** v. 94, n. 4, p. 1027–1076 , 2014.
- HE, Zhixiong *et al.* Effects of early malnutrition on mental system, metabolic syndrome, immunity and the gastrointestinal tract. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science** v. 71, n. 9, p. 1143–50 , 2009.
- HERMAN, Katya M. *et al.* Tracking of obesity and physical activity from childhood to adulthood: the physical activity longitudinal study. **International Journal of Pediatric Obesity** v. 4, n. October 2008, p. 281–288 , 2009.
- HONGU, N; SACHAN, D S. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. **The Journal of nutrition** v. 130, n. 2, p. 152–7 , Feb. 2000.
- HURT, Ryan T *et al.* Obesity Epidemic. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition** doi: 10.1177/0148607111415110, v. 35, n. 5\_suppl, p. 4S–13S , 31 Aug. 2011.
- JAENISCH, Rudolf; BIRD, Adrian. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics** v. 33, n. 3S, p. 245–254 , 2003.
- JANSEN, Pauline W *et al.* Children’s eating behavior, feeding practices of parents and weight problems in early childhood: results from the population-based Generation R Study. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity** v. 9, n. 1, p. 130 , 2012.
- JIMENEZ-CHILLARON, Josep C *et al.* Intergenerational Transmission of Glucose Intolerance. **Blood** v. 58, n. February , 2009.
- KARATSOREOS, Iliia N. *et al.* Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: A potential model of the metabolic syndrome in mouse. **Endocrinology** v. 151, n. 5, p. 2117–2127 , 2010.

- KERN, M *et al.* Insulin resistance induced by high-fat feeding is only partially reversed by exercise training. **Pflügers Archiv : European journal of physiology** v. 417, n. 1, p. 79–83 , 1990.
- KIM, Chul-Hee *et al.* Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism** v. 278, n. 6, p. E977 LP-E984 , 1 Jun. 2000.
- KIRCHNER, Henriette *et al.* *Epigenetic flexibility in metabolic regulation: Disease cause and prevention?* .**Trends in Cell Biology** .v.23, n. 5, p.203-209, 2013.
- KOPPLE, Joel D. Obesity and Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition** v. 20, n. 5, p. S29–S30 , 2010.
- KRASHES, Michael J. *et al.* Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released agRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. **Cell Metabolism** v. 18, n. 4, p. 588–595 , 2013.
- KWON, Eun Jin; KIM, Young Ju. What is fetal programming?: A lifetime health is under the control of in utero health. **Obstetrics and Gynecology Science** v. 60, n. 6, p. 506–519 , 2017.
- LAKER, Rhianna C. *et al.* Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1 $\alpha$  gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. **Diabetes** v. 63, n. 5, p. 1605–1611 , 2014.
- LANGLEY-EVANS, Simon C. Nutritional programming of disease: Unravelling the mechanism. **Journal of Anatomy** v. 215, n. 1, p. 36–51 , 2009.
- LEVIN, B E *et al.* Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)** v. 16, n. 10, p. 909–15 , Oct. 2000.
- LEVIN, Barry E; DUNN-MEYNELL, Ambrose a. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology** v. 286, n. 4, p. R771–R778 , 2004.
- LILLYCROP, Karen A. Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. **Proceedings of the Nutrition Society** v. 70, n. 1, p. 64–72 , 2011.
- LUCAS, A *et al.* Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. **BMJ (Clinical research ed.)** v. 300, n. 6728, p. 837–840 , 1990.
- LUCAS, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Archives of disease in childhood** v. 71, n. 4, p. 288–90 , 1994.
- LUCAS, A. *et al.* Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. **The Lancet** v. 335, n. 8704, p. 1477–1481 , Jun. 1990.
- LUQUET, Serge *et al.* NPY/AgRP neurons are essentials for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science** v. 310, n. 5748, p. 683–685 , 2005.

MAHMOOD, S. *et al.* Epigenetic changes in hypothalamic appetite regulatory genes may underlie the developmental programming for obesity in rat neonates subjected to a high-carbohydrate dietary modification. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** v. 4, n. 6, p. 479–490 , 2013.

MATHIAS, Paulo C.F. *et al.* Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming .**European Journal of Nutrition**. v.53. n.3, p. 711-722, 2014.

MICHELINI, Lisete Compagno. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. **Current hypertension reports** v. 9, n. 3, p. 214–221 , Jun. 2007.

NISTALA, Ravi *et al.* Prenatal Programming and Epigenetics in the Genesis of the Cardiorenal Syndrome. **Cardiorenal Medicine** v. 1, n. 4, p. 243–254 , 2011.

O'NEILL, Hayley M *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 108, n. 38, p. 16092–7 , 2011.

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.

PAES, S.T. *et al.* Childhood obesity: A (re) programming disease? **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** v. 7, n. 3 , 2016.

PARK, Soyong *et al.* Increased binding at 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. **Brain Research** v. 847, n. 1, p. 90–97 , Nov. 1999.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research** v. 20, n. 11, p. 1603–1612 , Nov. 2000.

PINHEIRO, Alessandra R. *et al.* Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. **Clinical Science** v. 114, n. 5, p. 381–392 , 2008.

PLAGEMANN, Andreas *et al.* Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. **NeuroReport** v. 10, n. 15, p. 3211–3216 , 1999.

PLAGEMANN, Andreas *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **J Physiol** v. 58720, p. 4963–4976 , 2009.

RAIPURIA, Mukesh; BAHARI, Hasnah; MORRIS, Margaret J. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. **PLoS ONE** v. 10, n. 4, p. 1–14 , 2015.

RAMAMOORTHY, Thanuja Gali *et al.* Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: Impact on energy balance control. **Frontiers in Neuroscience** , 2015.

RIBEIRO, Tatiane Aparecida *et al.* Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 7634 , 2017.

RÖCKL, Katja S C; WITCZAK, Carol A.; GOODYEAR, Laurie J. Signaling mechanisms in skeletal muscle: Acute responses and chronic adaptations to exercise. **IUBMB Life** v. 60, n. 3, p. 145–153 , 2008.

RYCKMAN, Kelli; SMITH, Caitlin. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy** v. Volume 8, p. 295 , Jun. 2015.

SHELDON, Ryan D *et al.* Gestational exercise protects adult male offspring from high-fat diet induced hepatic steatosis. **Journal of Hepatology** v. 64, n. 1, p. 171–178 , 2016.

SHEN, Youqing *et al.* Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. **Obesity (Silver Spring, Md.)** v. 23, n. 5, p. 1000–6 , 2015.

SIMEONI, Umberto *et al.* Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. **Seminars in fetal & neonatal medicine** v. 14, n. 2, p. 119–24 , Apr. 2009.

SIMMONS, R K *et al.* The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. **Diabetologia** v. 53, n. 4, p. 600–605 , 2010.

SIMMONS, Rebecca. Developmental origins of adult metabolic disease: Concepts and controversies. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v. 16, n. 8, p. 390–394 , 2005.

SLENTZ, C A; HOUMARD, J A; KRAUS, W E. Exercise, abdominal obesity, skeletal muscle, and metabolic risk: evidence for a dose response. **Obesity (Silver Spring)** v. 17 Suppl 3, n. December, p. S27-33 , 2009.

SLENTZ, Cris A. *et al.* Effects of exercise training alone vs a combined exercise and nutritional lifestyle intervention on glucose homeostasis in prediabetic individuals: a randomised controlled trial. **Diabetologia** v. 59, n. 10, p. 2088–2098 , 2016.

SOARES, D. D. *et al.* Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 78, n. 2, p. 255–261 , Jun. 2004.

STANFORD, Kristin I *et al.* Exercise Before and During Pregnancy Prevents the Deleterious Effects of Maternal High-Fat Feeding on Metabolic Health of Male Offspring. **Diabetes** v. 64, n. 2, p. 427–433 , 2015.

STECULORUM, Sophie M.; BOURET, Sebastien G. Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. **Endocrinology** v. 152, n. 11, p. 4171–4179 , 2011.

STEVENS, Adam; BEGUM, Ghazala; WHITE, Anne. Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: A mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? **European Journal of Pharmacology** v. 660, n. 1, p. 194–201 , 2011.

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

- TAIT, Alice H. *et al.* Successive generations in a rat model respond differently to a constant obesogenic environment. **PLoS ONE** v. 10, n. 7, p. 1–13 , 2015.
- TAYLOR, P. D. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 288, n. 1, p. R134–R139 , 2004.
- VANHEEST, Jaci L; RODGERS, Carol D. gestation on maternal and neonatal outcomes Effects of exercise in diabetic rats before and during Effects of exercise in diabetic rats before and during gestation on maternal and neonatal outcomes. **Am J Physiol Endocrinol Metab American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism by guest on August** v. 273, n. 2, p. 727–733 , 1997.
- VASUDEVAN, Chakrapani; RENFREW, Mary; MCGUIRE, William. Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition** v. 96, n. 5, p. F378 LP-F382 , 11 Aug. 2011.
- VEGA, C C *et al.* Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. **International Journal of Obesity** v. 39, n. 4, p. 712–719 , 2013.
- VISSCHER, Tommy L S; SEIDELL, Jacob C. The Public Health Impact of Obesity. **Annual Review of Public Health** doi: 10.1146/annurev.publhealth.22.1.355, v. 22, n. 1, p. 355–375 , 1 May 2001.
- VUCETIC, Zivjena *et al.* Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. **Endocrinology** v. 151, n. 10, p. 4756–4764 , 2010.
- WATERLAND, R. A. *et al.* Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. **International Journal of Obesity** v. 32, n. 9, p. 1373–1379 , 2008.
- WATERLAND, R A; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American journal of clinical nutrition** v. 69, n. 2, p. 179–97 , Feb. 1999.
- WATERLAND, Robert A. Epigenetic Mechanisms Affecting Regulation of Energy Balance: Many Questions, Few Answers. **Annual Review of Nutrition** v. 34, n. 1, p. 337–355 , 2014.
- WHITE, Christy L; PURPERA, Megan N; MORRISON, Christopher D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology** , 2009.
- WHITELAW, Nadia C.; WHITELAW, Emma. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. **Human Molecular Genetics** v. 15, n. SUPPL. 2, p. 131–137 , 2006.
- WOJTYŁA, Andrzej *et al.* Epidemiological studies in Poland on effect of physical activity of pregnant women on the health of offspring and future generations - adaptation of the hypothesis Development Origin of Health and Diseases. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** v. 19, n. 2, p. 315–326 , 2012.
- YAMADA-OBARA, Nana *et al.* Maternal exposure to high-fat and high-fructose diet evokes hypoadiponectinemia and kidney injury in rat offspring. **Clinical and Experimental Nephrology** v. 20, n. 6, p. 853–861 , 2016.

ZAMBRANO, E. *et al.* RAPID REPORT: Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. **The Journal of Physiology** v. 588, n. 10, p. 1791–1799 , 2010.

ZAMBRANO, Elena; NATHANIELSZ, Peter W. Relative contributions of maternal western-type high fat high sugar diets and maternal obesity to altered metabolic function in pregnancy. **J Physiol (Accepted Article)** v. 14, p. 4573–4574 , 2017.

ZHANG, Wei; CLINE, Mark A; GILBERT, Elizabeth R. Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. v.11, n.1, 2014.

## APÊNDICE A

## ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO



*Journal of Developmental Origins of Health and Disease* (2016), 7(5), 231–236  
 © Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2015  
 doi:10.1017/S2040174415007897  
 Themed issue: Ibero-American DOHAD Society

REVIEW

## Childhood obesity: a (re) programming disease?

S. T. Paes<sup>1\*</sup>, C. F. Gonçalves<sup>1</sup>, M. M. Terra<sup>1</sup>, T. S. Fontoura<sup>1</sup>, M. de O. Guerra<sup>1</sup>, V. M. Peters<sup>1</sup>, P. C. de F. Mathias<sup>2</sup> and A. E. Andreazzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

The aim of our article was to review the current literature on the effects of metabolic (re) programming on childhood obesity. PubMed/MEDLINE was the data source used to track the studies. Descriptors applied: children obesity, epigenetic, metabolic programming, exercise and nutrition. The focus was to analyze and discuss the international findings on the theme. The gathering of the papers was performed between June and August 2014. The search of articles with the descriptors used found 33,054 studies. In all, 5,709 studies were selected by crossing chosen keywords. Among these, after careful reading of the titles, 712 papers were considered potential as references. After applying inclusion/exclusion criteria, 50 studies were selected from 132 eligible abstracts. Most studies linked the development and treatment of obesity from epigenetically stimulated metabolic programming during the early stages of pregnancy and life. This review provides theoretical basis to the understanding that the programmed development of childhood obesity may be linked to early exposure to environmental factors, such as (nutrition and regular practice of exercise) and stimulus can epigenetically alter the modulation of the obesogenic metabolic behavior during pregnancy and the developmental stages of children and/or postpone the pathophysiologic disease stage to adulthood.

Received 24 August 2015; Revised 22 September 2015; Accepted 29 September 2015; First published online 26 October 2015

**Key words:** children obesity, epigenetics, exercise, metabolic programming, nutrition

### Introduction

The worldwide prevalence of childhood obesity is rapidly increasing in the last decades now characterized as a global epidemic.<sup>1</sup> Its etiology seems to be related to a number of factors, such as genetic polymorphisms, cellular hypothalamic signaling dysfunction, systemic inflammation, increased intestinal absorptive capacity, insulin resistance, among others.<sup>2</sup>

Childhood obesity is defined as an excessive accumulation of body fat in adipose tissue during childhood, with negative implications for health; in fact, its occurrence is the most important risk factor for the development of cardiovascular diseases in adulthood.<sup>1,2</sup> Therefore, lowering these risk factors early in life is a priority in terms of public health measures, since many lifestyle traits and characteristics are developed during this time.<sup>3,4</sup>

Current knowledge about genetics and molecular biology leads to an interpretation of the obesity pathogenesis as a complex and multifactorial phenomenon.<sup>5</sup> Different factors, both genetic and nutritional, may act as triggers for the emergence of physiological dysfunctions involved in the etiology of obesity, especially when associated with a sedentary lifestyle.<sup>6–8</sup>

Many studies indicate the nutritional composition of food as one of the main agents responsible for triggering metabolic responses to body weight gain, set by both the molecular and energy food components.<sup>9–11</sup> Thus, it is believed that the

nutritional component acts as a key element in the intricate network of obesogenic factors.<sup>9</sup>

However, several studies show that the positive energy balance, in which the daily energy consumption from the diet exceeds the energy expenditure of physical activity, is not the main agent of obesity, as seen in the intricate network of pathophysiological factors involved in the possible origin of the disease.<sup>12–15</sup>

It is speculated that inside the intricate network of factors related to the onset of obesity, hormonal defects and/or enzymatic signaling activated by the specificity of some nutrients and/or sedentary behavior can trigger chronic molecular mechanisms that pathologically disrupt cellular homeostasis in the long term and cause a systemic state of metabolic dysfunction.<sup>16,17</sup>

In the last decades researchers have postulated that the etiology of obesity may have an epigenetic character. Environmental factors can influence the expression of genes capable of chronically modulate metabolic response of various energy systems of an individual.<sup>18–23</sup>

Epigenetic is defined as the biological ability to stimulate cell differentiation changes in human gene, but does not involve changes in the DNA sequence of the organism (i.e., gene silencing, cloning, genetic reprogramming, genomic imprinting). Environmental factors such as nutrition, exercise and hormonal imbalances can modify the gene expression and stimulate changes in the molecular biochemical behavior of biological systems.<sup>24</sup> However, these stimuli cannot be explained by the changes in the DNA sequence itself.

\*Address for correspondence: S. T. Paes, Rua José Lourenço Kelm, Marília, Juiz de Fora, MG 36036-330, Brazil.  
 (Email: santpaes@ufjf.br)

## APÊNDICE B

### RESUMOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Lade, CG ; PETERS, V. M. ; TERRA, M. M. ; ANDREAZI, A. E. ; GUERRA, M. O. **COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS MODELOS PARA INDUÇÃO DE OBESIDADE EM CRIAS DE RATAS WISTAR.** In: 14º Congresso da Sociedade de Animais de Laboratório, 2016, Porto Alegre. 14º Congresso da Sociedade de Animais de Laboratório, 2016.

Lade, CG ; TERRA, M. M. ; ANDREAZI, A. E. ; PETERS, V. M. ; COSTA, V. M. G. ; BOLOTARI, M. ; GUERRA, M. DE O. . **MORPHOLOGY AND METABOLISM IN FEMALE WISTAR RATS SUBMITTED TO DIFFERENT OVERWEIGHT INDUCTION METHODS.** In: V congresso AACYTAL/SAIC, 2016, Mar del Plata. MEDICINA - Buenos Aires. BUENOS AIRES: ESTUDIO SIGMA S.R.L, 2016. v. 76. p. 1-330.

NOGUEIRA, A. O. ; LOPES, J. F. ; FONTOURA, T. S. ; TERRA, M. M. ; ANDREAZZI, A. E. ; GUERRA, M. DE O. ; PETERS, V. M. **AVALIAÇÃO METABÓLICA E REPRODUTIVA DE FILHOTES MACHOS DE MÃES ALIMENTADAS COM DIETA HIPERCALÓRICA.** Em: Seminário de Iniciação científica Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

LOPES, J. F. ; NOGUEIRA, A. O. ; FONTOURA, T. S. ; TERRA, M. M. ; ANDREAZI, A. E. ; GUERRA, M. DE O. ; PETERS, V. M. **AVALIAÇÃO DE PADRÕES DE MEMÓRIA E ANSIEDADE DE FILHOTES MACHOS DE MÃES ALIMENTADAS COM DIETA HIPERCLÓRICA.** Em: Seminário de Iniciação científica Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

LOPES, J. F. ; TERRA, M. M. ; ANDREAZZI, A. E. ; NOGUEIRA, A. O. ; FONTOURA, T. S. ; GUERRA, MARTHA DE OLIVEIRA ; PETERS, VERA MARIA . **EFEITO DA DIETA HIPERCALÓRICA MATERNA NA MASSA DOS ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTOR DOS FILHOTES MACHOS EM RATOS WISTAR.** In: XXIV Reunión Bienal da la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana - ALIRH, 2015, Lima.. XXIV Reunión Bienal da la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana - ALIRH, 2015.

## APÊNDICE C

### ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

O artigo intitulado “**TRANSGENERATIONAL EFFECTS OF MATERNAL CHRONIC EXPOSITION TO HIGH SUGAR/FAT DIET AND PHYSICAL TRAINING**” foi submetido ao periódico Journal of Physiology (Qualis A1).

Marcella Martins Terra<sup>1\*</sup>, Tamiris Schaeffer Fontoura<sup>1</sup>, Audryo Oliveira Nogueira<sup>1</sup>, Jéssica Ferraz Lopes<sup>1</sup>, Paulo César de Freitas Mathias<sup>2</sup>, Ana Eliza Andreazzi<sup>1</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>1</sup>, Vera Maria Peters<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora – Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá – UEM - Brasil

\*Autor para correspondência

**Marcella Martins Terra** – e-mail: marcellaterra@yahoo.com.br

Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário Bairro: São Pedro.

CEP: 36036-000

900. Telefone: +55 32 21023251

● **JPhysiol Staff** <jphysiol@physoc.org>

Para marcellaterra@yahoo.com.br

📧 11/26/17 às 8:13 PM ★

Dear Miss Terra,

Thank you for registering at The Journal of Physiology's online submission web site.

Your login information is provided below:

Login: marcella

████████████████████

You can also use the link below to be taken directly to the site:

<https://fp.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A4JS2COX7A3Qwd7J5A9ftdGYZDhJBFvVheRTAaJ01ONQZ>

Regards,

## APÊNDICE D

O artigo intitulado: “**TRANSGENERATIONAL EVALUATION OF EFFECTS OF HYPERCALORIC DIET PHYSICAL TRAINING ON METABOLISM, ANXIETY AND MEMORY IN RATS.**” foi submetido para o periódico European Journal of Nutrition (Qualis A1).

Tamiris Schaeffer Fontoura<sup>1</sup> Marcella Martins Terra<sup>1\*</sup>, Audryo Oliveira Nogueira<sup>1</sup>, Jéssica Ferraz Lopes<sup>1</sup>, Paulo César de Freitas Mathias<sup>2</sup>, Ana Eliza Andreazzi<sup>1</sup>, Martha de Oliveira Guerra<sup>1</sup>, Vera Maria Peters<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora – Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá – UEM - Brasil

\*Autor para correspondência

**Marcella Martins Terra** – email: marcellaterra@yahoo.com.br

Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora

Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário Bairro: São Pedro.

CEP: 36036-

900. Telefone: +55 32 21023251

## ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética no Uso de Animais

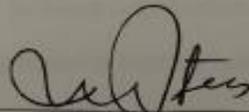
## CERTIFICADO

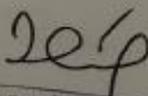
Certificamos que o Protocolo nº. 067/2013 – CEUA sobre “Treinamento físico em ratas obesas reverte a adiposidade e alterações metabólicas na prole?”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VERA MARIA PETERS, com a colaboração de MARCELLA MARTINS TERRA e ANA ELIZA ANDREAZZI, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 360 ratos (200 fêmeas e 160 machos), da linhagem Wistar, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/03/2014 a 01/03/2017.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 067/2013 - CEUA about “Treinamento físico em ratas obesas reverte a adiposidade e alterações metabólicas na prole?” under responsibility of VERA MARIA PETERS, with collaboration of MARCELLA MARTINS TERRA and ANA ELIZA ANDREAZZI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 360 rats (200 female and 160 male) of the Wistar lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/03/2014 to 01/03/2017.

Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente  
CEUA

  
\_\_\_\_\_  
Vice-presidente  
CEUA