

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

Carlos Gabriel de Lade

**EFEITOS DE DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO NO
METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REPRODUTIVO DE
RATOS WISTAR SUPERALIMENTADOS NA INFÂNCIA**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Martha de Oliveira Guerra

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Eliza Andreazzi

Juiz de Fora

2019

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

Carlos Gabriel de Lade

**Efeitos de diferentes tipos de treinamento físico no metabolismo,
desenvolvimento físico e reprodutivo de ratos Wistar superalimentados
na infância**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Martha de Oliveira Guerra

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Eliza Andreazzi

Juiz de Fora

2019

Carlos Gabriel de Lade

**Efeitos de diferentes tipos de treinamento físico no metabolismo,
desenvolvimento físico e reprodutivo de ratos Wistar superalimentados
na infância**

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Martha de Oliveira Guerra (Orientadora)
Universidade Federal de
Juiz de Fora

Dr. Mateus Camaroti Laterza
Universidade Federal de
Juiz de Fora

Dr. Rodrigo Hohl
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Antônio Paulo André de Castro
IF Sudeste de Minas Gerais

Dr. Valter Paulo Neves Miranda
Faculdade do Sudeste Mineiro

À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foram que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença espiritual durante parte dessa caminhada, significou segurança e certeza de que não estava sozinho. Meus irmãos, pela confiança e apoio. À minha querida e amada Hionara, pela presença, apoio, paciência e abdição durante todos esses anos para que eu conseguisse realizar esse sonho. Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram nessa luta.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Agradeço a todos os professores, em especial à Dr^a Ana Eliza Andreazzi e Dr^a Vera Maria Peters, por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. Obrigado pela incansável dedicação e confiança. Ao amigo e eterno professor, Dr. Paulo Roberto dos Santos Amorim, espelho e inspiração para caminhada que decidi seguir. Sou grato principalmente à Dr^a Martha de Oliveira Guerra, minha orientadora mais atenciosa, que muito contribuiu com a realização dessa pesquisa e na minha formação como professor, pesquisador e ser humano.

Agradeço à minha mãe Tecla, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai Carlos, que apesar de todas as imensuráveis dificuldades, me fortaleceu e se faz presente em todos os momentos da minha vida. Apesar de não estar fisicamente presente nesse momento, espero que esteja sentindo-se orgulhoso.

Obrigado meus irmãos, Isabela e David, meu sobrinho Thales e meu cunhado Christian, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. À D. Silvani, pelo apoio e carinho durante essa caminhada. À minha querida Hionara pela apoio incondicional, companheirismo, abdicção, incentivo e amor durante todo esse processo.

Meus eternos agradecimentos aos amigos Vinícius, Mariana, Beatriz, Carolina, Leonardo, Marcella, Tamiris, Priscila, Jessica e Daniela, companheiros de trabalho e de luta, irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e vão continuar presentes em minha vida de agora em diante. Às Redes Mineiras TOXIFAR e Bioterismo - FAPEMIG pelo financiamento do projeto. A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado. A todo corpo técnico-administrativo do Centro de Biologia da Reprodução.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

Introdução: A obesidade está associada a diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2, podendo ter origem nos estágios iniciais da vida, como no período de lactação, por meio da programação metabólica. A atividade física auxilia na redução dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, mesmo com pequenas perdas de peso e, em crianças, pode desempenhar um papel essencial na prevenção do ganho de peso e outros problemas de saúde. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos protocolos de treinamento de *endurance* de intensidade moderada e intervalado de alta intensidade (HIIT) sobre os parâmetros relacionados à obesidade e a capacidade cardiorrespiratória em ratos Wistar superalimentados durante todo o período de amamentação.

Métodos: Dois dias após o nascimento, quarenta ratos Wistar machos e quarenta fêmeas foram agrupados em dois grupos: Grupo Ninhada Controle (NC; dez animais / ninhada) e Grupo Ninhada Reduzida (NR; quatro animais / ninhada). No desmame (21^o dia), os animais NR foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: sedentário, treinamento de *endurance* de intensidade moderada e HIIT, enquanto os animais NC foram agrupados em um grupo sedentário. O treinamento teve duração de oito semanas, com frequência de três vezes por semana. Foram realizados testes da capacidade cardiorrespiratória, peso corporal, consumo alimentar, bioquímica sorológica, testes de tolerância glicose e insulina e quantificação da gordura retroperitoneal e perigonadal. Para verificarmos possíveis alterações nos animais NR, foram realizadas comparações entre os grupos NCSed com seus respectivos grupos NRSed, utilizando os testes de *t* de Student ou Mann-Whitney. Para possíveis interações entre sexo e tipo de treinamento, foi utilizado ANOVA *two way*, enquanto o ANOVA *one way* seguido do post hoc de Tukey foi utilizado para as comparações intragrupos de animais NR machos e fêmeas, separadamente. Para a obtenção dos resultados do TOTG, a área total sob a curva glicêmica foi calculada. Os resultados são expressos como média \pm DP (desvio padrão) e nível de significância adotado $p < 0,05$.

Resultados: O peso corporal de machos e fêmeas NR, antes do desmame, foi significativamente maior quando comparado aos animais NC. Essa diferença foi mantida entre os grupos NCSed e NRSed após o desmame durante todos os períodos avaliados. A adiposidade foi significativamente maior nos machos NRSed quando comparados aos machos NCSed, e também foram observadas alterações no metabolismo glicêmico. Os protocolos de *endurance* e HIIT foram eficientes na melhora da capacidade cardiorrespiratória máxima, bem como no metabolismo glicêmico e no acúmulo de gordura central de machos e fêmeas submetidos à superalimentação infantil pelo método de redução de ninhadas.

Conclusões: Tanto o treinamento de resistência moderada quanto os protocolos de HIIT incluídos no início da vida foram eficientes em reverter ou prevenir certas alterações metabólicas como consequência da superalimentação durante a amamentação em ratos Wistar machos e fêmeas.

Palavras-chave: obesidade infantil, controle da obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, exercício aeróbico, treinamento intervalado de alta intensidade, ratos.

ABSTRACT

Background: Obesity is associated with several comorbidities, such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, and may have its origin in early life stages, such as in the lactation period, through metabolic programming. Physical activity aids in decreasing the chances of developing cardiovascular and metabolic diseases, even with small weight losses and, in children, can play an essential role in preventing weight gain and other health problems. The present study aimed to evaluate the effects of moderate intensity endurance training and high intensity interval training (HIIT) protocols on obesity-related parameters and cardiorespiratory capacity in overfed Wistar rats throughout the breastfeeding period.

Methods: Two days after birth, forty male and forty female Wistar rats were clustered into two groups: Control Litter Group (CL; ten animals/litter) and Reduced Litter Group (RL; four animals/litter). At weaning (21th day), RL animals were distributed randomly into three experimental groups: sedentary, moderate intensity endurance training and HIIT, while CL animals were clustered into a sedentary group. The training lasted eight weeks, often three times a week. Cardiorespiratory capacity, body weight, food intake, serological biochemistry, glucose and insulin tolerance tests and quantification of retroperitoneal and perigonadal fat were performed. Aiming to detect possible alterations in RL animals, comparisons between CLSed groups and their respective RLSed groups were carried out by

applying a t-Student or Mann–Whitney test. Regarding possible alterations between sex and types of training, a two-way ANOVA was applied, while a one-way ANOVA, followed by a Tuckey post hoc test was applied when comparing, separately, RL males and females from the same group. In order to obtain the OGTT results, the total area under the glycaemia curve was computed. Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation) at a significance level of $p < 0.05$.

Results: RL male and female body weight, before weaning, was significantly higher when compared with CL animals. This difference was maintained between CLSed and RLSed groups after weaning during all assessed periods. Adiposity was significantly higher in RLSed males when compared to CLSed males, and alterations in glycaemic metabolism were also observed. Endurance and HIIT protocols were efficient in improving maximal cardiorespiratory capacity, as well as concerning the glycaemic metabolism and central fat accumulation of males and females submitted to childhood overfeeding by the litter reduction method.

Conclusions: Both moderate endurance training and HIIT protocols included in early life were efficient in reverting or preventing certain metabolic alterations as a consequence of overfeeding during breastfeeding in male and female Wistar rats.

Keywords: childhood obesity, obesity management, insulin resistance, glucose intolerance, aerobic exercise, high intensity interval training, rats.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Epidemiologia da Obesidade	19
2.2. Obesidade e comorbidades associadas	21
2.3. O estilo de vida moderno e obesidade	22
2.4. Consequências endócrinas da obesidade: resistência à insulina	24
2.5. Programação metabólica e obesidade	30
2.5.1. Evidências epidemiológicas e experimentais sobre a programação metabólica	32
2.5.2. A sobrenutrição durante a fase de lactação pelo método de redução de ninhadas	36
2.6. Obesidade e exercícios físicos	40
2.6.1. Aspectos gerais do exercício físico e obesidade	40
2.6.2. Tipos de exercícios físicos e obesidade	42
2.7. Programação metabólica por redução de ninhadas e exercícios físicos	46
3. HIPÓTESE	48
4. OBJETIVOS	49
5. MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1. Animais	50
5.2. Grupos experimentais	51
5.3. Testes da aptidão cardiorrespiratória (VO ₂ máx.) e protocolos de treinamento	53
5.4. Massa corporal, adiposidade central, consumo de ração e pesagem dos órgãos	55
5.5. Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Teste de Tolerância à Insulina (TTI)	56
5.6. Análises bioquímicas	56
6. RESULTADOS	58
Artigo 1 - “Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats”	59
Artigo 2 – “Effect of post-natal overfeeding on the male and female wistar rat reproductive parameters”	60
RESUMOS	61
7. COMENTÁRIOS GERAIS	63

8. CONCLUSÃO.....	68
9. REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A – Artigo 1	90
APÊNDICE B – Artigo 2	104
APÊNDICE C – RESUMOS	130
APÊNDICE D – Comparação do consumo máximo de oxigênio intra e intergrupos de machos e fêmeas NCSed, NRSed, NREnd e NRHIIT em três momentos.....	136
ANEXO A - Certificado de aprovação para realização do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF)	137

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo devido à relação direta na morbimortalidade adulta. A obesidade é uma condição crônica que se caracteriza pelo aumento da gordura corporal resultante, basicamente, do desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético (MARTIN; MANI; MANI, 2015; PAPAS *et al.*, 2007).

O aumento da prevalência do sobrepeso/obesidade em vários países tem sido descrito como pandemia global (NG *et al.*, 2014), sendo considerado um dos principais fatores de risco e com relação direta em 5% das mortes no mundo (WHO, 2009).

A prevalência mundial de obesidade praticamente dobrou entre 1980 e 2014. Em 2014, 39% dos adultos acima de 18 anos, sendo 38% dos homens e 40% das mulheres, estavam acima do peso, e 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesos (WHO, 2014). De acordo com Martin, Mani e Mani (2015), a obesidade é o maior problema de saúde pública do século XXI, com dois bilhões de pessoas sendo classificadas com sobrepeso ou obesidade. As implicações do aumento da prevalência do sobrepeso/obesidade para a saúde, qualidade de vida, produtividade e custos diretos relacionados aos cuidados com a saúde são alarmantes (POPKIN; ADAIR; NG, 2012). Em 2014, o impacto econômico global estimado e relacionado com a obesidade foi de US\$ dois trilhões, representando 2,8% do PIB (Produto Interno Bruto) global. Além do excesso de gastos com saúde, a obesidade também impõe custos sob a forma de perda de produtividade e perda de crescimento econômico como

resultado do afastamento do trabalho, menor produtividade, mortalidade e incapacidade permanente (TREMMELE *et al.*, 2017).

Fatores ambientais, principalmente os relacionados ao estilo de vida moderno, são considerados estímulos potentes para a obesidade. A diminuição dos níveis de atividade física, aumento do comportamento sedentário e da ingestão calórica são os fatores ambientais determinantes mais fortes para o ganho de peso corporal e de comorbidades associadas (ROBERTS *et al.*, 2013). No entanto, a amplitude desse fenômeno indica que outros aspectos, tais como fatores socioeconômicos, genética, epigenética e estresse, são subestimados, porém possuem importância fundamental na ocorrência da obesidade (ABESO, 2016; HABBOUT *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm demonstrado que a gestação e a lactação podem ser consideradas períodos críticos para alterações futuras do estado nutricional e hormonal da prole, sendo essa relação denominada programação metabólica (DE MOURA; PASSOS, 2005). Por exemplo, o ganho de peso excessivo durante a gestação e falta de perda de peso do neonato após o parto são importantes preditores de obesidade em longo prazo (ABESO, 2016). Essas informações tornam-se relevantes à medida que, em 2013, mais de 42 milhões de crianças com idade menor que cinco anos apresentavam sobrepeso (WHO, 2014).

Na maioria dos mamíferos o desenvolvimento de diversos órgãos não está completo ao nascimento, sendo continuado durante a fase de lactação. Portanto, estímulos ambientais de origem física, mental ou nutricional nessa fase do desenvolvimento podem influenciar a expressão gênica na prole, teoricamente, promovendo alterações fisiológicas devido a esse ambiente.

Estímulos nutricionais como a sub e supernutrição nessa fase do desenvolvimento podem ser responsáveis por alterações nas vias hipotalâmicas envolvidas no metabolismo e no equilíbrio energético (RINALDI *et al.*, 2014). Em longo prazo essas alterações predisõem o organismo a desordens metabólicas na fase adulta (HABBOUT *et al.*, 2013; PORTELLA *et al.*, 2015). Em roedores, a superalimentação durante a fase de lactação pode ser induzida pela redução do número de filhotes da ninhada padrão (10-12 filhotes) para 3-4 filhotes (ninhada reduzida), resultando em aumento da ingestão calórica devido a menor competição durante a amamentação. Além da instalação do quadro precoce de hiperglicemia, acúmulo de gordura e obesidade (PORTELLA *et al.*, 2015), ratos e camundongos provenientes de ninhadas reduzidas podem apresentar, na fase adulta, sobrepeso, obesidade, resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (BEI *et al.*, 2015), hiperfagia, intolerância à glicose, dislipidemia e aumento da pressão arterial (PORTELLA *et al.*, 2015). Esse modelo de indução de obesidade precoce tem se tornado relevante como objeto de investigação, visto que a obesidade na infância e adolescência estão correlacionadas com a presença de síndrome metabólica na fase adulta (RINALDI *et al.*, 2014).

Paralelamente, em estudo realizado com crianças lactentes alimentadas com fórmula, foi observado que a magnitude do ganho de peso durante a primeira semana de vida pode ser fundamental para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta (STETTLER *et al.*, 2005). A diferença de crescimento entre lactentes amamentados e alimentados com fórmula são maiores nas primeiras semanas pós-natal, período em que os lactentes amamentados muitas vezes perdem peso, enquanto que os alimentados com fórmulas

tendem a ganhar peso (SINGHAL; LANIGAN, 2007). Esses relatos sustentam a hipótese de aceleração do crescimento, que propõe que o rápido crescimento infantil pode alterar o metabolismo e síndrome metabólica, inclusive a obesidade na vida adulta (WAHLQVIST *et al.*, 2016a).

A inatividade física é um dos principais fatores de risco para mortalidade em todo o mundo, sendo responsável por 3,2 milhões de mortes a cada ano. Adultos insuficientemente ativos apresentam aumento de 20-30% no risco de morte por todas as causas quando comparados com aqueles que atingem o mínimo de 150 minutos de atividades físicas de intensidade moderada por semana (WHO, 2014). A prática regular de atividades físicas diminui o risco de doenças coronarianas e metabólicas. Além disso, é um ponto determinante para o gasto energético, sendo fundamental no balanço energético, controle do peso corporal e prevenção da obesidade (DONNELLY *et al.*, 2009; WHO, 2014).

Evidências demonstram que a prática de 150 a 250 minutos de atividade física moderada por semana, com gasto calórico entre 1200 e 2000 Kcal, seria suficiente para prevenir o ganho de peso. Além disso, a prática regular de atividades físicas auxilia na diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, melhora a aptidão física e de indicadores de saúde em indivíduos com sobrepeso e obesidade, mesmo com perdas mínimas de peso corporal (DONNELLY *et al.*, 2009; SWIFT *et al.*, 2014).

Sessões de exercícios aeróbicos prolongadas de intensidade moderada ou *endurance*, realizadas durante várias semanas, aumentam a capacidade oxidativa do músculo esquelético, alterando o substrato energético utilizado

durante o esforço e resultando no aprimoramento da capacidade aeróbica. Entretanto, estudos recentes demonstram que o *High Intensity Interval Training* (HIIT) alteram o metabolismo energético do músculo esquelético e se assemelha às adaptações causadas pelo treinamento aeróbico de intensidade moderada (GIBALA *et al.*, 2006; GIBALA; MCGEE, 2008).

Há um crescente número de evidências, em indivíduos saudáveis, demonstrando que o HIIT leva a benefícios cardiovasculares e metabólicos semelhantes ou superiores do que aqueles atingidos como treinamento de *endurance* moderado (BURGOMASTER *et al.*, 2005; CIOLAC *et al.*, 2010; LITTLE *et al.*, 2010; NYBO *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados da literatura ainda demonstram controvérsias em relação à comparação de efetividade de protocolos de HIIT com protocolos de *endurance* moderado em relação à elaboração de estratégias para o manejo do sobrepeso/obesidade e complicações associadas.

Apesar da relação entre a prática regular de atividades físicas e a prevenção e controle da obesidade já estar bem referenciada na literatura, a influência de diferentes tipos de treinamento físico nas alterações bioquímicas e metabólicas ocasionadas pela superalimentação em fases críticas como a lactação e infância ainda precisa ser investigada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT) caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal resultante do desequilíbrio prolongado entre a ingestão e o gasto energético. Sua etiologia é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, ambientais, comportamentais e socioculturais (HASLAM; JAMES, 2005; PINHO *et al.*, 2013; SARTURI; NEVES; PERES, 2010).

O índice de massa corporal (IMC) é uma ferramenta simples, de baixo custo, eficaz e amplamente utilizada e para avaliar e classificar indivíduos ou populações em relação à massa corporal, sendo utilizado o cálculo da divisão do peso corporal em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros. O resultado classifica o indivíduo em abaixo do peso, peso normal, sobrepeso ou obesidade, como descrito na Tabela 1.

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

IMC (kg/m ²)	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

WHO, 2014.

Apesar do IMC ser um bom indicador, é uma ferramenta não indicativa da quantidade de gordura corporal, pois os resultados desse indicador pode variar em função do sexo, idade, etnia e na comparação de indivíduos sedentários com atletas (ABESO, 2016). Porém diversos estudos têm demonstrado a utilidade do IMC como marcador de risco de morbidade,

mortalidade e desfechos de saúde, tanto em homens quanto em mulheres (BRAY, 2004; KOPP, 2003; THE GLOBAL BMI MORTALITY COLLABORATION, 2016).

2.1. Epidemiologia da Obesidade

A crescente prevalência do sobrepeso e obesidade em muitos países tem sido descrita como uma pandemia global (NG *et al.*, 2014). Em 2010, o sobrepeso e a obesidade foram diretamente relacionados a 3,4 milhões de mortes, diminuição de 4% na expectativa de vida e 4% dos anos-vida com saúde prejudicada por incapacidades relacionadas (LIM *et al.*, 2012). De acordo com Martin, Mani e Mani (2015), a obesidade é o maior problema de saúde pública do século XXI, com dois bilhões de pessoas sendo classificadas com sobrepeso ou obesidade. A prevalência mundial de obesidade praticamente dobrou entre 1980 e 2014. Em 2014, 39% dos adultos acima de 18 anos, sendo 38% dos homens e 40% das mulheres, estavam acima do peso, e 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesos (WHO, 2014).

Estudos recentes têm utilizado dados estatísticos de um grande número de países para estimar as taxas de prevalência e implantação de projetos em todas as regiões do mundo. A tendência natural seria pensar que países de maior renda apresentariam as maiores taxas populacionais de sobrepeso e obesidade quando comparados com áreas rurais e países de média e baixa renda. Entretanto, novas evidências sugerem uma alteração nesse padrão e o aumento da prevalência do sobrepeso e obesidade nos países de baixa e média renda tem implicações importantes para a desigualdade social em saúde (POPKIN; ADAIR; NG, 2012; VIGITEL, 2017; WHO, 2014).

Entre 1980 e 2013, a proporção de adultos apresentando IMC igual ou superior a 25 Kg/m² aumentou em praticamente todos os países do mundo, de 28,8% para 36,9% em homens e de 29,8% para 38% em mulheres. Em crianças e adolescentes, a prevalência tem aumentado substancialmente em países desenvolvidos, sendo 23,8% dos meninos e 22,6% das meninas apresentavam sobrepeso ou obesidade em 2013. A prevalência do sobrepeso e obesidade também tem se elevado em crianças e adolescentes nos países em desenvolvimento, de 8,1% para 12,9% nos meninos e de 8,4% para 13,4% nas meninas em 2013 (HRUBY; HU, 2016).

Os resultados do programa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2017) revelou que, em 10 anos, a prevalência do sobrepeso no Brasil aumentou de 42,6% para 53% da população, representando um aumento de 26,3%. Nas mulheres, essa taxa passou de 38,5% para 50,5% e, em homens, de 47,5% para 57,7%. Já em relação à obesidade, houve aumento de 60% de 2006 para 2016, passando de 11,8% para 18,9% da população considerada obesa. Estratificado por sexo, a prevalência de obesidade de mulheres passou de 12,1% para 19,6%, enquanto nos homens esse aumento foi de 11,4% para 18,1%.

Além disso, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014), a prevalência do sobrepeso em crianças com idade pré-escolar está aumentando nos países de baixa e média renda. A última estimativa da prevalência do sobrepeso e obesidade em crianças abaixo de 5 anos de idade aumentou de 5% em 2000 para 6% em 2010, e 6,3% em 2013, totalizando 42 milhões de crianças abaixo de 5 anos apresentando tais condições. A estimativa, em 2013, estava em torno de 18 milhões de crianças abaixo de 5

anos com sobrepeso/obesidade na Ásia, 11 milhões na África e 4 milhões na América Latina, sendo que as estimativas dessa prevalência podem atingir 11% nessa faixa etária até 2025 (WHO, 2014). Em uma perspectiva mais ampla, mais 340 milhões de crianças e adolescentes apresentavam sobrepeso ou obesidade em 2016, sendo essa prevalência aumentada de 4% em 1975 para 18% em 2016 (WHO, 2017). Essa condição torna-se particularmente importante, já que crianças e adolescentes com excesso de peso correlacionam-se com o sobrepeso na vida adulta (BETTIOL *et al.*, 2007).

2.2. Obesidade e comorbidades associadas

As DCNTs constituem um dos principais problemas de saúde no mundo devido a sua alta ocorrência e expressão no padrão de morbidade adulta (BHUPATHIRAJU; HU, 2016). Em uma escala mundial, as DCNT são a causa primária de 65% das mortes (LOZANO *et al.*, 2011) e 54% de anos de vida saudáveis perdidos com saúde prejudicada (MURRAY *et al.*, 2012).

O excesso de peso aumenta, consideravelmente, os riscos relativos para a incidência e controle do diabetes *mellitus* Tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, alguns tipos de câncer, apnéia obstrutiva do sono e osteoartrite, das concentrações séricas de LDL e triglicerídeos, diminuição na concentração de HDL, além de afetar o desempenho reprodutivo (AL-ZAHRANI, 2014; ANDAKI *et al.*, 2012; BRAY, 2004; DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2004; LIM *et al.*, 2012; POIRIER *et al.*, 2006; ROWLAND, 2007; WHO, 2014). Estão diretamente relacionados ao excesso de peso corporal, 44% dos casos do diabetes, 23% de doenças isquêmicas do coração e entre 7% e 41% de

determinados tipos de câncer (WHO, 2016). Essas doenças têm relação direta com o aumento da morbidade e mortalidade, resultando em gastos públicos e privados elevados, representados por hospitalizações, afastamento do trabalho, perda de produtividade e aposentadorias precoces (BLOOM *et al.*, 2017).

2.3. O estilo de vida moderno e obesidade

O termo “obesidade” não existia na língua inglesa até o século XVII, sendo utilizados termos como “gordura excessiva” ou “corpulência”. Apenas no século XVIII o impacto do excesso de peso na qualidade de vida das pessoas começou a ter destaque, sendo reconhecido como causas de problemas de saúde no século XIX e, somente nas primeiras décadas do século XX, a mortalidade e complicações associadas começaram a ser documentadas (EKNOYAN, 2006).

Para compreendermos e enfrentarmos a epidemia de obesidade é necessário esclarecer e compreender as causas desse fenômeno. Tradicionalmente, a obesidade tem sido abordada e estudada apenas nas vertentes fisiológicas e bioquímicas. Dentre os fatores que contribuem diretamente para o aumento da gordura corporal destacam-se o balanço energético, fatores genéticos, composição da dieta, nível de atividade física, comportamento alimentar, inflamação, fatores endócrinos, psicológicos, além de fatores sociais (HRUBY; HU, 2016). Entretanto, em uma perspectiva evolucionista, os estoques de energia representam uma estratégia e um componente importante da forma de como os organismos e os seus descendentes se adaptam ao ambiente (WELLS, 2006).

Evidências acumuladas para a natureza multifatorial da obesidade e a disponibilidade de informações a respeito da termodinâmica do metabolismo alimentar estabeleceram o que há muito tempo, intuitivamente, foi assumido: a causa do aumento da gordura corporal de um indivíduo está relacionada com o desequilíbrio energético entre a ingestão de alimentos e a energia gasta nas atividades diárias (BRAY, 2004; EKNOYAN, 2006). O aumento da deposição de gordura corporal é um processo adaptativo que se tornou uma “má adaptação”, principalmente quando os avanços tecnológicos alteraram o equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, especialmente na despesa calórica para a obtenção de alimentos (EKNOYAN, 2006).

Ao longo de décadas a sociedade mundial passou por mudanças drásticas nos hábitos alimentares e de atividades físicas, entrando em confronto com a biologia humana e gerando grandes alterações na composição corporal dos indivíduos (POPKIN; ADAIR; NG, 2012). Apesar da etiologia da obesidade ser considerada multifatorial, ou seja, vários fatores estão envolvidos nas desordens metabólicas como os ambientais, metabólicos, genéticos, fisiológicos, comportamentais e sociais (BRAY, 2004; PAES *et al.*, 2016), em uma última análise, a incidência do sobrepeso e obesidade é o reflexo do desequilíbrio energético, de modo que a principal área de intervenção compreende o equilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico (DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008).

O desenvolvimento tecnológico reduziu o gasto energético nas ocupações laborais mais intensas, como agricultura e mineração, por exemplo, bem como nos setores de serviço e produção (BELL; GE; POPKIN, 2001). Além disso, mudanças nos sistemas de transporte (BELL; GE; POPKIN, 2002),

atividades de lazer e serviços domésticos (MONDA *et al.*, 2008) também reduziram o gasto energético com a diminuição dos níveis de atividades físicas da população.

Além da diminuição do dispêndio energético diário, nas últimas décadas a população mundial está aumentando o consumo de alimentos com alta densidade calórica, alta palatabilidade, baixo poder de saciedade e de fácil digestão e absorção, o que contribui diretamente para o aumento da ingestão calórica, contribuindo para o desequilíbrio energético (ABESO, 2016; ROSS; DESAI, 2014).

O desequilíbrio energético é parcialmente resultado de sensíveis mudanças socioeconômicas inevitáveis a partir do início do século XX nos países desenvolvidos. Entretanto, o crescimento econômico, a crescente disponibilidade de alimentos de baixo custo e pobres em nutrientes, industrialização, mecanização do transporte e urbanização já proporcionam um ambiente “obesogênico” nos países de rendas baixa e média (HRUBY; HU, 2016).

2.4. Consequências endócrinas da obesidade: resistência à insulina

A resistência à insulina e o DM2 são amplamente associados a valores de Índice de Massa Corporal (IMC) iguais ou maiores que 30 Kg/m². Além disso, a obesidade está associada a um risco aumentado de doença coronariana, acidente vascular cerebral hipertensão, dislipidemia e mortalidade por todas as causas (NIELSEN *et al.*, 2014). Valores de IMC superiores a 35 Kg/m² aumenta a resistência periférica à insulina, insulina circulante e, conseqüentemente, a glicemia sanguínea, elevando o risco de DM2 em 60

vezes nas mulheres e 42 vezes no homens (BRAY, 2004; KOPP, 2003). Entretanto, muitos estudos relacionando os valores de IMC com o risco de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos, porém saudáveis, relataram resultados inconsistentes, já que a maioria dos estudos sobre essa questão não considerara a distribuição regional de gordura corporal (TCHERNOF; DESPRES, 2013). A literatura a respeito da distribuição e metabolismo do tecido adiposo tem mostrado que a proporção do acúmulo de gordura intrabdominal é um ponto chave no aumento do risco para a saúde associado ao sobrepeso e obesidade (DESPRES, 2011; JENSEN, 2008; MATSUZAWA; FUNAHASHI; NAKAMURA, 2011).

Alguns estudos avaliaram a contribuição do tecido adiposo subcutâneo e intrabdominal na dislipidemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia em homens e mulheres obesos. Tanto em homens quanto em mulheres, os autores encontraram que aqueles com baixos níveis de gordura intrabdominal apresentavam tolerância à glicose semelhante com controles magros. Entretanto, obesos com níveis elevados de gordura visceral apresentaram alterações nas respostas glicêmicas e insulinêmicas ao teste de oral de tolerância à glicose, resultados que representam o aumento do risco de desenvolvimento de DM2 (GOODPASTER *et al.*, 2005; GOODPASTER; KRISHNASWAMI; HARRIS, 2003; MATSUZAWA, 2014; ROSS *et al.*, 2002a; ROSS *et al.*, 2002b), sendo esse padrão de associação também repetido em crianças e adolescentes obesos (AUCOUTURIER *et al.*, 2009).

Estudos a respeito da morbidade relacionada à obesidade indicam que a gravidade das complicações associadas, como o DM2, doenças cardiovasculares e dislipidemia não se correlacionam necessariamente com o

acúmulo total de gordura corporal, mas com o local da distribuição da gordura excedente (MATSUZAWA, 2008; MATSUZAWA, 2014). Esse fato particularmente se confirma em um estudo em alguns países asiáticos, incluindo o Japão, onde a prevalência de DM2 é semelhante a outros países ocidentais, embora a prevalência de obesidade seja bem inferior (AKRAM *et al.*, 2000). Atualmente, alguns autores tem sugerido que, além do aumento da concentração de ácidos graxos livres, citocinas inflamatórias, liberadas pela gordura visceral na veia porta, elevam a resistência à insulina sistêmica e no fígado (ITEM; KONRAD, 2012).

A resistência à insulina é caracterizada pelo comprometimento da ação da insulina, sendo o estado insulino resistente definido por alterações da captação de glicose pelo músculo esquelético, tecido adiposo e fígado e aumento da produção hepática de glicose, resultando no estado hiperglicêmico tanto em jejum quanto pós prandial, sendo considerada o principal elo entre a obesidade e o DM2 (CASTRO *et al.*, 2014; JAYANTHI *et al.*, 2017). A resistência à insulina também é caracterizada por alterações no metabolismo lipídico (aumento da lipólise) e proteico no músculo esquelético (diminuição da síntese proteica), afetando também outros tecidos como vasos sanguíneos (hipertensão), cérebro (aumento da ingestão calórica), pâncreas (diminuição do volume das células β e sensibilidade à glicose), ossos (diminuição da densidade mineral e resistência óssea), entre outros efeitos (GASTALDELLI; GAGGINI; DEFRONZO, 2017; JO *et al.*, 2009; PEARSON *et al.*, 2016).

O desequilíbrio crônico entre o consumo e o gasto energético causa o aumento dos estoques intracelulares de energia, na forma de triglicerídeos nos adipócitos, aumentando não só o tamanho dessas células (hipertrofia) como

também sua quantidade (hiperplasia). Esse excesso no armazenamento de gordura parece causar anormalidades funcionais no retículo endoplasmático e mitocôndrias, que são consideradas organelas primárias, prejudicadas pelos efeitos fisiopatológicos do excesso de peso corporal (DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007). Porém, várias observações apontam que, mais do que o excesso de gordura, mas especificamente, o aumento do tecido adiposo central (visceral, omental e intrabdominal) desempenha um papel crucial nessas associações quando comparado com a adiposidade periférica (CASTRO *et al.*, 2014; ZHANG X *et al.*, 2013).

Recentemente, porém ainda contraditório, o estresse oxidativo tem sido apontado como um provável mecanismo envolvido na sinalização da insulina (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017). O desequilíbrio energético, excesso de gordura estocada no tecido adiposo e aumento nas concentrações de lipídeos e glicose circulantes acarretam o aumento da atividade do retículo endoplasmático. O estresse do retículo endoplasmático aumenta o estresse oxidativo nas mitocôndrias, assim como o aumento dos ácidos graxos livres, sendo o estresse oxidativo definido como o desequilíbrio dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumentados pela redução de compostos que protegem contra danos causados por radicais livres e peróxidos (FRIDLAND; PHILIPSON, 2006; TCHERNOF; DESPRES, 2013). O aumento de ERO é bastante evidente no tecido adiposo de indivíduos obesos, sendo que a produção crônica aumentada de ERO pode resultar em disfunção mitocondrial no fígado e no músculo esquelético, ocasionando acúmulo de

lipídeos nesses tecidos e contribuindo para o aumento da resistência à insulina (KANG *et al.*, 2010).

Além do estresse ocasionado no retículo endoplasmático, os adipócitos hipertrofiados podem levar à hipóxia local, ocasionando a infiltração de macrófagos e a morte celular. A infiltração de macrófagos desencadeia o aumento da produção e secreção de citocinas inflamatórias (FERRANTE, 2007; NEELS, JAAP G.; OLEFSKY, 2006) como a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e, conseqüentemente, leva à inflamação crônica de baixo grau em níveis local e sistêmico, comprometendo a sinalização da insulina (FERRANTE, 2007; WOOD; TRAYHURN, 2006; TCHERNOF; DESPRES, 2013). A inflamação crônica de baixo grau, causada pela secreção aumentada de citocinas, pode alterar o metabolismo glicêmico e lipídico, elevando o risco de doenças cardiometabólicas em indivíduos com obesidade visceral, sendo o tamanho do adipócito e localização corporal do excesso de gordura considerados fatores determinantes para o aumento da secreção de adipocinas inflamatórias (DROLET *et al.*, 2009; SKURK *et al.*, 2007). No início dos anos 90, um grande passo para o reconhecimento do papel secretor do tecido adiposo ocorreu com a descoberta de que a citocina pró inflamatória TNF- α é sintetizada e liberada pelos adipócitos (WOOD; TRAYHURN, 2006).

Alguns mecanismos fisiopatológicos da relação entre o aumento da gordura corporal com a resistência à insulina e doenças cardiovasculares permanecem inconclusivos, porém um mecanismo bem aceito refere-se à maior produção de citocinas produzidas pelo tecido adiposo hipertrofiado (HOLLAND *et al.*, 2011). Dentre essas citocinas inflamatórias, destacam-se a

IL-6 e o TNF- α . Entretanto, somam-se mais de cinquenta os tipos diferentes dessas proteínas, que também conhecidas como adipocinas ou adipocitocinas (MAEDA, SHIMOMURA, MIZUNO, 1997; MATSUZAWA, 2014). Níveis elevados de citocinas inflamatórias circulantes caracterizam o quadro conhecido como inflamação crônica de baixo grau, sendo associado diretamente à síndrome da resistência à insulina (KOPP, 2003). A principal exceção a esse padrão de aumento de síntese e secreção de citocinas refere-se à diminuição da produção e secreção da adiponectina em indivíduos obesos. Dada a ação anti-inflamatória dessa citocina, esse fato eleva o estado de inflamação do tecido adiposo, aumentando a infiltração de macrófagos e, conseqüentemente, a produção de citocinas pró inflamatórias, sendo considerada uma das principais causas de síndrome metabólica (MATSUZAWA, 2008).

Os adipócitos hipertrofiados são considerados fundamentais no desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos obesos, destacando-se os pertencentes ao tecido adiposo visceral e subcutâneo da parte superior do corpo, principalmente devido à liberação de ácidos graxos livres, bem como a secreção aumentada de leptina e resistina, além da diminuição da secreção de adiponectina na circulação (CASTRO *et al.*, 2014), potencializando o risco de doenças cardiometabólicas em indivíduos com obesidade visceral (DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008; FERRANTE, 2007; WOOD; TRAYHURN, 2006).

A associação entre obesidade e resistência à insulina pode ser considerada uma relação de causa-efeito, já que estudos em humanos e em modelos animais indicam que a perda ou ganho de gordura corporal

correlacionam-se diretamente com o aumento ou diminuição da sensibilidade periférica à insulina, respectivamente (KANG *et al.*, 2010). Em relação à concentração de adiponectina, essa apresenta associação inversa com a obesidade visceral e resistência à insulina dada a sua propriedade anti-inflamatória e de aumento da sensibilidade à insulina (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2015).

2.5. Programação metabólica e obesidade

A obesidade infantil tem sido consistentemente considerada um forte fator de risco para a obesidade e complicações associadas na idade adulta (ALLCOCK; GARDNER; SOWERS, 2009; PARK *et al.*, 2012). Há evidências de efeitos adversos dessa condição na infância sobre a saúde na vida adulta, como aumento do risco de doença coronariana, DM2, câncer de cólon, artrite e gota, sendo classificada como fator de risco independente, mesmo o indivíduo permanecendo obeso ou não na idade adulta (HABBOUT *et al.*, 2013; REILLY; KELLY, 2011). Portanto, a obesidade infantil pode ser apontada como um exemplo de como condições metabólicas adversas durante fases importantes do desenvolvimento humano podem impactar no estado de saúde de um indivíduo.

O desenvolvimento intrauterino e pós-natal são considerados momentos importantes para a plasticidade e críticos para a maturação dos sistemas fisiológicos, o que pode influenciar no aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de patologias em longo prazo, como DM2, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, doenças coronarianas e alguns tipos de câncer (WATERLAND; GARZA, 1999). Nesses períodos ocorrem o desenvolvimento e

a maturação do sistema nervoso central (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2002), portanto estímulos do ambiente durante a fase do desenvolvimento intrauterino e de lactação podem contribuir para o desencadeamento de patologias na vida adulta, fenômeno denominado programação metabólica (KATZMARZYK *et al.*, 2014). Adaptações moleculares negativas podem levar a alterações fisiopatológicas, afetando respostas hormonais e celulares, centrais e periféricas, que podem aumentar ou silenciar a expressão de genes relacionados ao apetite e ao controle do peso corporal (PAES *et al.*, 2016). Essa condição é aceita como um dos principais determinantes da saúde no curso de vida da prole (LUCAS, 2013), pois esses estímulos podem influenciar a expressão genômica no indivíduo, através de mecanismos epigenéticos, levando a adaptações aquelas condições.

A epigenética é um termo utilizado para definir mudanças na expressão gênica, sem que ocorra nenhuma alteração na sequência do código genético (KIRCHNER *et al.*, 2013; SKINNER, 2011). Em qualquer período da vida, um indivíduo está suscetível a alterações epigenéticas, podendo levar ao desenvolvimento de certas patologias (VAISERMAN, 2014).

O fato de que o ambiente no qual o indivíduo é exposto durante o desenvolvimento possa ter impacto em longo prazo na sua condição de saúde é conhecido como “Hipótese de Barker”. Essa hipótese propõe que respostas a estímulos inadequados recebidos do ambiente durante o desenvolvimento, como a desnutrição materna, fetal e infantil podem atuar como prevenção a uma possível condição ambiental de escassez de alimentos na vida adulta, levando a adaptações que ajudam a preparar para uma melhor sobrevivência nesse ambiente (BRENSKEKE *et al.*, 2013). De acordo com essa teoria, a

desnutrição durante o desenvolvimento intrauterino poderia desenvolver o chamado “fenótipo poupador” (HALES; BARKER, 2001), ou seja, um indivíduo exposto a essa condição pode se adaptar e apresentar baixa estatura, baixa taxa metabólica e baixos níveis de atividade motora para conservar energia. Se esse mesmo indivíduo for exposto mais tardiamente a uma condição de maior oferta de alimentos, este apresentará maior risco de desenvolvimento de obesidade, doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia, maior risco de desenvolver esteatose hepática não alcoólica e DM2 (VAISERMAN, 2014).

2.5.1. Evidências epidemiológicas e experimentais sobre a programação metabólica

A primeira evidência que apoia os efeitos da programação metabólica na prole sobre o desenvolvimento da obesidade vem de estudos epidemiológicos em populações humanas, especificadamente durante a Segunda Guerra Mundial. Em novembro de 1944, os alemães impuseram um embargo ao transporte de alimentos para a Holanda, impondo um curto, porém severo período de restrição alimentar aos holandeses, onde a porção de comida diminuiu de 1000 kcal/dia em dezembro de 1944, para 400-800 Kcal/dia em abril de 1945. Em maio de 1945, os holandeses foram libertados, com aumento imediato na ingestão de alimentos para mais de 2000 kcal/dia. Em um período conhecido como Fome de Inverno Holandesa, os descendentes de mulheres expostas à desnutrição durante o primeiro trimestre de gestação possuíam maiores riscos de desenvolvimento de obesidade e maiores incidências de doenças cardiovasculares e DM2 (JIANG *et al.*, 2013; ROSEBOOM *et al.*, 2001), destacando a importância de se considerar períodos críticos de

desenvolvimento, onde o crescimento fetal pode ser influenciado por estímulos ambientais adversos.

Ao contrário dos resultados do estudo sobre a fome holandesa, crianças nascidas durante o cerco de Leningrado (Rússia), foram expostas a períodos mais prolongados de subnutrição combinados com menores quantidades de alimentos mesmo após o final do cerco, sendo que não houve nenhuma associação entre a exposição à desnutrição e a incidência de doenças metabólicas na vida adulta. A privação de alimentos durante o período pós-natal torna-se particularmente importante, já que impede o aumento do peso de rebote, como verificado em indivíduos expostos à fome holandesa durante a gestação, sugerindo que há uma interação entre o ambiente pós-natal e a vida adulta, auxiliando na compreensão do “fenótipo poupador” e da importância da magnitude do ganho de peso pós-natal no desenvolvimento de doenças metabólicas na idade adulta (STANNER; YUDKIN, 2001).

Ao abordar a questão de como a má nutrição poderia afetar a saúde fetal em termos de desenvolvimento de doenças tardias, diversos modelos têm sido utilizados para induzir a restrição do crescimento e do desenvolvimento fetal em modelos experimentais. Um dos modelos mais utilizados é o de restrição calórica durante a gestação. A restrição do aporte alimentar para 30% da média de consumo de ração em ratas gestantes resulta em baixo peso da prole ao nascimento, permanecendo por quatro meses e recuperando o peso normal com trinta semanas, porém apresentando maior porcentagem de gordura corporal, hiperfagia e hipertensão mesmo antes da recuperação do peso corporal (VICKERS *et al.*, 2000). Proles de mães expostas à restrição alimentar também podem apresentar sensibilidade reduzida à leptina,

hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, obesidade (KRECHOWEC *et al.*, 2006), DM2 (JIANG *et al.*, 2013) e diminuição da atividade locomotora (VICKERS *et al.*, 2003).

Além desse modelo, a restrição do aporte proteico durante a gestação induz efeitos similares e consequências na saúde da prole, como obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertensão arterial sistêmica e respostas exacerbadas a dietas com altas concentrações de gorduras (SARR; YANG; REGNAULT, 2012), diminuição da expressão de genes hipotalâmicos relacionados com sinalização da insulina, metabolismo lipídico e glicolítico, o que pode estar envolvido com a programação de doenças metabólicas (OROZCO-SOLÍS *et al.*, 2010).

Ao contrário de animais que são expostos a restrição alimentar durante a gestação, roedores subnutridos durante a lactação, através do modelo experimental de aumento de ninhadas, geralmente permanecem protegidos quanto ao desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas (LÓPEZ-SOLDADO; MUNILLA; HERRERA, 2006).

A maior parte dos estudos a respeito da programação metabólica está focada na relação da subnutrição e no baixo peso ao nascer em doenças tardias. Apesar disso, evidências sugerem que crianças acima do peso ao nascer e com medida da circunferência abdominal elevada apresentam maiores índices de mortalidade por doenças cardiovasculares. Registros de crianças apresentando peso corporal no nascimento acima de 4 Kg demonstram a manutenção de maiores riscos de desenvolvimento de obesidade infantil e adulta (WENG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2011), incidência precoce de síndrome metabólica (WANG; YOUFA; BEYDOUN, 2007) e DM2

(HARDER *et al.*, 2007). Em modelos experimentais, a administração de dietas com altas taxas de gorduras em camundongos fêmeas, por vários meses, tem como consequência, além da obesidade e/ou DM2 nas mães, a incidência dessas condições nos filhotes, o mesmo comportamento encontrado em estudos que utilizaram ratos como modelo experimental (VELKOSKA; MORRIS, 2011), sendo esses resultados semelhantes aos estudos realizados em humanos (O'REILLY; REYNOLDS, 2013; VASUDEVAN; RENFREW; MCGUIRE, 2011).

Estudos realizados em seres humanos e em modelos experimentais têm abordado a hipótese da “Origem Fetal de Doenças em Adultos” para estabelecer a relação dos estímulos adversos durante a fase intrauterina do desenvolvimento e doenças na prole durante a fase adulta. Esse fenômeno, denominado “programação fetal”, descreve o processo através do qual estímulos “in útero” promovem respostas e adaptações permanentes favorecendo doenças tardias. Entretanto, estímulos do ambiente durante outros períodos importantes do desenvolvimento na vida pós-natal, como a sobrenutrição na lactação (HABBOUT *et al.*, 2013), também podem ser considerados relevantes para alterações metabólicas na vida adulta (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005).

Stettler *et al.* (2005) demonstraram associação positiva entre o rápido ganho de peso na primeira semana de vida após o nascimento e o desenvolvimento de obesidade duas ou três décadas depois, principalmente em lactentes alimentados com fórmulas. Estudos anteriores demonstraram associação entre o rápido ganho de peso nos primeiros dias de vida e a alimentação por fórmulas (BAKER *et al.*, 2004; DEWEY *et al.*, 2001) e maiores

riscos de obesidade na adolescência (GILLMAN, 2001; VON KRIES *et al.*, 1999), o que contribuiu para a compreensão da programação metabólica, além de estratégias para a prevenção da obesidade precoce e consequências em longo prazo.

2.5.2. A superalimentação durante a fase de lactação pelo método de redução de ninhadas

O modelo de redução de ninhada é um método de manipulação de ninhadas utilizado para o estudo da superalimentação no período pós-natal, precisamente durante a fase de lactação, para conhecer efeitos imediatos e tardios dessa condição no decorrer da vida desses animais (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Esse método consiste na redução do número de filhotes logo após o nascimento para facilitar e promover aos filhotes remanescentes o maior acesso ao leite materno, caracterizado por uma menor competição entre os animais da ninhada. O procedimento é relativamente simples e consiste na redução do número de animais, normalmente de 8-12 filhotes por ninhada dependendo da espécie, para 3-4 filhotes no primeiro ou segundo dia pós-natal, de acordo com o protocolo utilizado.

Como consequência da redução de ninhada, esses animais têm maior aporte calórico, apresentam aumento significativo do peso corporal antes do desmame, quando comparados com animais provenientes de ninhada padrão (8-12 animais), sendo que essas diferenças tendem a permanecer ou até mesmo aumentar mesmo quando esses animais são desmamados e alimentados com ração padrão.

O método de redução de ninhada é um dos vários modelos utilizados para indução de sobrepeso/obesidade em modelo experimental, se destacando principalmente devido a facilidade de execução e o alto custo-benefício. A superalimentação durante a fase de lactente, período considerado crítico no desenvolvimento de vários órgãos e sistemas dos filhotes pode, através de vias epigenéticas, levar a desregulação hormonal capaz de alterar vias hipotalâmicas responsáveis pelo balanço energético, aumento no apetite e diminuição de gasto energético (PLAGEMANN *et al.*, 2009).

Há alguns anos, o mesmo modelo foi utilizado para demonstrar que ratos provenientes de ninhadas reduzidas não apenas eram afetados quanto ao crescimento somático, mas também aumentava desproporcionalmente a deposição da gordura corporal. Mais importante, os autores demonstraram que o aumento do tecido adiposo foi resultado não somente da deposição de gordura, mas também do número de células adiposas. Esses resultados demonstram que o número de adipócitos pode ser alterado mediante mudanças nutricionais em estágios iniciais da vida (KNITTLE; HIRSCH, 1968). Esse fato pode ser considerado importante para a compreensão da obesidade, já que se sabe que há aumento do número de células de gordura na obesidade humana, porém o processo da perda de peso reduz principalmente o volume dos adipócitos sem promover qualquer alteração no número de células (SALANS; CUSHMAN; WEISMANN, 1973).

Além da instalação do quadro precoce de hiperglicemia e aumento da gordura corporal (PORTELLA *et al.*, 2015), ratos e camundongos provenientes de ninhadas reduzidas podem apresentar, na fase adulta, sobrepeso, obesidade, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia (BEI *et al.*,

2015), hiperfagia, intolerância à glicose, dislipidemia e aumento da pressão arterial (PORTELLA *et al.*, 2015). Esse modelo de indução de obesidade precoce tem se tornado relevante como objeto de investigação, visto que a obesidade na infância e adolescência está correlacionada com a presença de síndrome metabólica na fase adulta (RINALDI *et al.*, 2014).

Além do que é bem estabelecido a respeito dos efeitos da redução de ninhada na adiposidade, metabolismo de glicose e lipídeos, existem outras alterações patológicas relacionadas à superalimentação na lactação como aumento de marcadores de estresse oxidativo no miocárdio (HABBOUT *et al.*, 2013; HABBOUT *et al.*, 2012), alterações no desenvolvimento renal e insuficiência renal na idade adulta (BOUBRED *et al.*, 2007, 2009; YIM *et al.*, 2014), hipertrofia cardíaca precoce, fibrose cardíaca tardia e disfunções vasculares (LEITE *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2009; VELKOSKA *et al.*, 2008).

Entretanto, a concentração de hormônios circulantes influencia múltiplos aspectos do desenvolvimento hipotalâmico e desempenha importante papel na formação dos circuitos neurais. Assim, a alteração de algum desses fatores essenciais durante períodos críticos do desenvolvimento pode promover alterações estruturais permanentes em animais superalimentados em consequência da redução de ninhadas (REYNOLDS *et al.*, 2015).

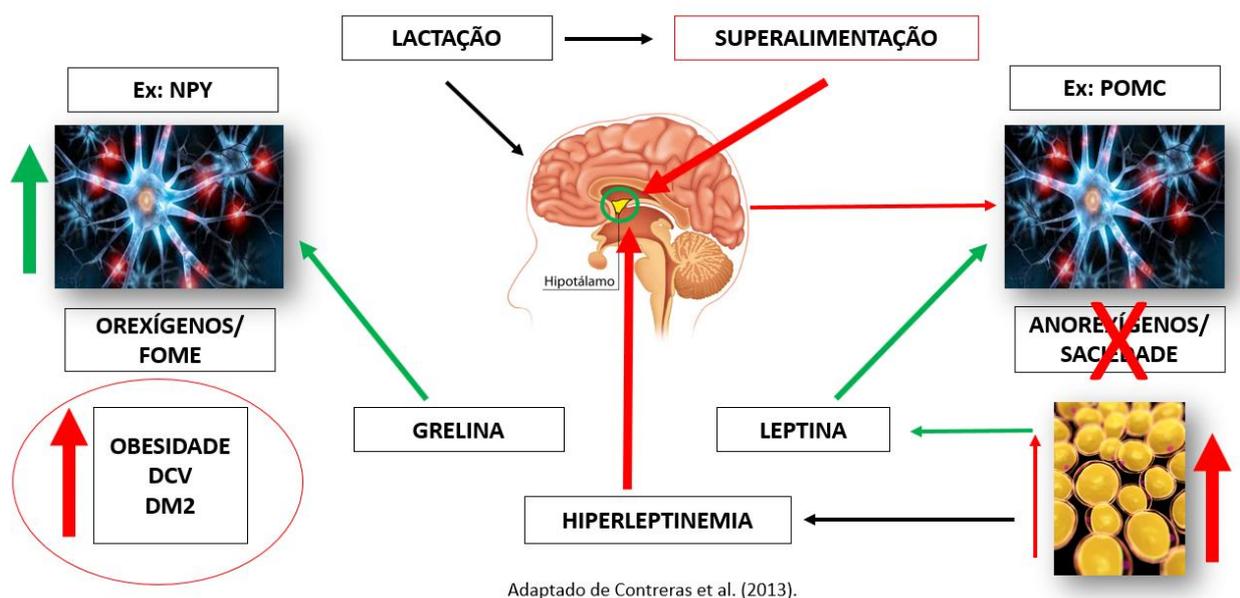
Regiões específicas do hipotálamo têm papel fundamental no controle da fome e saciedade por meio de sinais periféricos, incluindo a sinalização por hormônios gastrintestinais (grelina), leptina, insulina, citocinas, entre outros. Esses sinais transmitem o estado metabólico do tecido adiposo ao Sistema

Nervoso Central, que por sua vez envia sinais necessários à periferia para o controle da alimentação e da homeostase energética (BLUNDELL, 2006).

O hipotálamo é considerado o centro cerebral primário na regulação da ingestão calórica e controle do peso corporal. O neuropeptídeo Y (NPY) desempenha papel chave nesse controle, particularmente por atuar no eixo orexígeno do núcleo arqueado e paraventricular do hipotálamo. A expressão do NPY nesse eixo é inibida pela insulina e leptina, o que é considerado como um sinal de saciedade, enquanto a diminuição das concentrações de insulina e leptina e aumento da grelina circulantes levam a ativação do NPY, o que estimula a ingestão de alimentos (HABBOUT *et al.*, 2013).

As primeiras observações a respeito de alterações hipotalâmicas em consequência da superalimentação em estágios iniciais da vida mostraram resistência à insulina e leptina no núcleo arqueado levando ao aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético (GLAVAS *et al.*, 2010; PATEL; SRINIVASAN, 2010; PATEL; SRINIVASAN, 2011). Esses animais apresentaram, aos vinte e um dias de vida (desmame), hiperinsulinemia e aumento da expressão de NPY nos núcleos arqueado e paraventricular (PLAGEMANN *et al.*, 1999), o que sugere que tais alterações hipotalâmicas podem ser programadas pela concentração elevada de insulina, uma vez que esse hormônio é primordial para o desenvolvimento de áreas específicas do hipotálamo. Além disso, estudos demonstraram que a hiperleptinemia em animais provenientes de ninhadas reduzidas só é verificada a partir da segunda semana de vida e acompanhada de hiperinsulinemia (SCHMIDT *et al.*, 2001), sendo que aos 60 dias de vida esses animais não apresentam diferenças na expressão de receptores de leptina no hipotálamo, sugerido o desenvolvimento

de uma resistência hipotalâmica a esse hormônio (LÓPEZ *et al.*, 2007), como é demonstrado pela Figura 1.



NPY: Neuropeptídeo Y; POMC: Pro-opiomelanocortina

2.6. Obesidade e atividades físicas

2.6.1. Aspectos gerais da atividade física e obesidade

Evidências classificam a prática regular de atividades e exercícios físicos como opção de tratamento não medicamentoso na prevenção e controle da obesidade em crianças e adultos, com sensíveis melhoras do estado metabólico mesmo sem alterações no peso corporal (FOSTER *et al.*, 2017).

Diversos benefícios à saúde geral estão relacionados com a prática regular de atividades físicas, entre eles a melhora da aptidão cardiovascular, força muscular e função vascular (MCGEE, 2005; SINGH *et al.*, 2008). Além disso, a prática de atividades físicas regulares está associada à melhora da composição corporal, com a diminuição do percentual de gordura e aumento da massa muscular, assim diminuindo o risco do sobrepeso e obesidade na vida

adulta, além da morbidade e mortalidade associadas a essas condições (MCGEE, 2005; MILLARD-STAFFORD *et al.*, 2013). Evidências classificam a prática regular de atividades e exercícios físicos como opção de tratamento não medicamentoso na prevenção e controle de DCNTs, dentre elas a obesidade em crianças e adultos, com sensíveis melhoras do estado metabólico mesmo sem alterações no peso corporal (FOSTER *et al.*, 2017).

Porém, as discussões em torno da ciência da atividade física em crianças e adolescente podem se tornar confusas. Nos adultos, apenas a prática regular de atividades físicas de intensidade moderada e vigorosa é considerada insuficiente para a perda de peso corporal, mas necessária para sua manutenção após um processo de emagrecimento. Independentemente desse fato, a prática regular de atividades físicas é considerada um componente fundamental no controle do peso corporal em adultos (WILLIAMS *et al.*, 2015), além de crianças e adolescentes (KELLEY; KELLEY; PATE, 2014).

O dispêndio energético total diário pode ser dividido em: taxa metabólica basal (60% a 70%); efeito térmico dos alimentos (5% a 10%) e pelo gasto de energia com atividade física. Especificamente, a atividade física é o mais importante componente variável do gasto energético diário em adultos, representando cerca de 20% a 30% (ABESO, 2016), porém não há indícios de qual seria a prescrição mais adequada. Tanto para adultos quanto para crianças e adolescentes, não há um consenso de qual seria a duração, intensidade e frequência ideais na prescrição de exercícios com o objetivo de controle e perda de peso corporal. Entretanto, o aumento do gasto energético

diário com a diminuição do sedentarismo e da inatividade física é determinante para a perda de peso (ABESO, 2016; SWIFT *et al.*, 2014).

Evidências demonstram que a prática de 150 a 250 minutos de atividade física moderada por semana, com gasto calórico entre 1200 e 2000 Kcal, seria suficiente para prevenir o ganho de peso. Já em relação à perda de peso, é provável que o aumento dos níveis de atividades físicas seja relevante, entretanto o tempo menor que 150 minutos por semana parece ser insuficiente para esse objetivo. Acima de 150 minutos/semana resulta em perdas modestas de 2-3 Kg e, de 225-420 minutos/semana, em 5-7,5 Kg quando comparado com o peso inicial. Apesar da inserção de planos de atividades físicas regulares fornecer resultados modestos na perda de peso, essa estratégia é parte fundamental em associação com outras intervenções como a reeducação alimentar. Além disso, a prática regular de atividades físicas auxilia na diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, melhora a aptidão física e de indicadores de saúde em indivíduos com sobrepeso e obesidade, mesmo com perdas mínimas de peso corporal (DONNELLY *et al.*, 2009; SWIFT *et al.*, 2014).

2.6.2. Tipos de exercícios físicos e obesidade

Sessões de exercícios aeróbicos prolongadas de intensidade moderada ou *endurance*, realizadas durante várias semanas, aumentam a capacidade oxidativa do músculo esquelético, alterando o substrato energético utilizado durante o esforço e resultando no aprimoramento da capacidade aeróbica (ROCHA *et al.*, 2016). Entretanto, estudos recentes demonstram que sessões curtas e repetidas de exercícios de alta intensidade alteram o metabolismo

energético do músculo esquelético e que se assemelha às adaptações causadas pelo treinamento aeróbico de intensidade moderada tradicional (GIBALA *et al.*, 2006). Além disso, adaptações metabólicas normalmente associadas ao treinamento de *endurance* com alto volume pode ser induzido mais rapidamente com períodos menores de treinamento, característica do treinamento intervalado de alta intensidade (*high intensity interval training* - HIIT) (GIBALA; MCGEE, 2008).

O treinamento de *endurance* induz diversas adaptações de natureza morfológica e metabólica na musculatura esquelética, incluindo a biogênese mitocondrial e maior capacidade de oxidação de substratos energéticos, como glicose e lipídios (LITTLE *et al.*, 2010). O HIIT poderia, potencialmente, causar adaptações generalizadas e benefícios para a saúde de maneira eficiente e em um menor tempo, quando comparado com o treinamento aeróbico de intensidade moderada. Esse tipo de treinamento envolve períodos curtos de esforço em alta intensidade intercalados com intervalos de esforço de baixa intensidade. Há um crescente número de evidências, em indivíduos saudáveis, demonstrando que o HIIT leva a benefícios cardiovasculares e metabólicos semelhantes ou superiores do que aqueles atingidos como treinamento aeróbico contínuo (BURGOMASTER *et al.*, 2005; CIOLAC *et al.*, 2010; LITTLE *et al.*, 2010; NYBO *et al.*, 2010).

Weston *et al.* (2014) relataram que sessões de HIIT realizadas entre 85-95% da frequência cardíaca máxima, aumentaram a capacidade cardiorrespiratória em quase duas vezes quando comparada com resultados obtidos com o treinamento de *endurance* moderado em pacientes comprometidos por DCNT. Entretanto, em adultos saudáveis e ativos, a

diferença dos dois tipos de treinamento é considerada irrelevante (BACON et al., 2013). Gomes-Neto *et al.* (2017) relataram que pode haver uma superioridade no VO₂ de pico com o HIIT em pacientes com doença arterial coronariana quando comparados com pacientes que realizaram treinamento de *endurance* moderado. Porém essas diferenças desaparecem quando o ajuste para o gasto energético entre os dois protocolos foi realizado.

Em relação à perda de peso e controle metabólico em indivíduos com sobrepeso e obesos, a literatura científica apresenta dados ainda inconsistentes. Em uma meta-análise, Türk *et al.* (2017) analisaram e compararam estudos envolvendo adultos com obesidade em relação à efetividade do HIIT e *endurance* na aptidão cardiorrespiratória e composição corporal. Em dezoito estudos incluídos na análise, o HIIT foi mais efetivo na melhora da aptidão cardiorrespiratória e na diminuição da gordura corporal em comparação com o treinamento de *endurance*. Porém, analisando os efeitos do HIIT e *endurance* em mulheres jovens e obesas, Kong *et al.* (2016) verificaram que os dois protocolos foram eficientes no aumento da aptidão cardiorrespiratória e na redução de hormônios sexuais (testosterona e estradiol). Entretanto, o grupo treinado em *endurance* apresentou melhora significativa na composição corporal, o que não ocorreu com o grupo treinado em HIIT.

Fisher *et al.* (2015) distribuíram vinte e oito homens com sobrepeso/obesidade em grupos de treinamento HIIT e *endurance* moderado, durante seis semanas, para avaliar a efetividade dos dois protocolos em diversas variáveis. Com isso, concluíram que não houve diferenças entre os dois tipos de treinamento. Ambos foram efetivos e sem diferenças quanto a

sensibilidade à insulina, redução no percentual de gordura corporal, redução da concentração sérica de lipídeos sanguíneos e aumento na aptidão cardiorrespiratória.

O exercício de endurance moderado tem sido comumente prescrito para melhorar a composição corporal, capacidade física e parâmetros de saúde em crianças e adultos. Entretanto, recentemente o interesse pelo HIIT tem aumentado, principalmente pelos mesmos benefícios alcançados com o treinamento de endurance moderado, mas com duração inferior. Embora estudos comparativos entre os dois tipos de exercícios tenham aumentado, poucos comparam esses efeitos em crianças acima do peso. CORTE DE ARAUJO *et al.*, 2012 comparam os efeitos de protocolos endurance moderado e HIIT, durante doze semanas, em crianças obesas, concluindo que os dois tipos de treinamento foram eficazes em melhorar o VO_2 de pico e saúde geral. Duas meta-análises (GARCÍA-HERMOSO *et al.*, 2016; JELLEYMAN *et al.*, 2015) compararam protocolos de HIIT e endurance moderado. Os autores verificaram que o HIIT pode ser considerado mais efetivo para melhorar diversos parâmetros de saúde, como o VO_2 máx. e resistência à insulina, com menor volume de treinamento. Porém, os autores destacam diversas limitações, entre elas o número de estudos incluídos e duração das intervenções, fazendo-se necessárias mais investigações para afirmações conclusivas.

Os resultados da literatura ainda demonstram controvérsias em relação à comparação de efetividade de protocolos de HIIT em comparação com protocolos de *endurance* moderado em relação à elaboração de estratégias para o manejo do sobrepeso/obesidade e complicações associadas.

2.7. Programação metabólica por redução de ninhadas e exercícios físicos

Poucos estudos abordam a relação direta ou indireta do treinamento físico em animais provenientes de ninhadas reduzidas e nos efeitos em longo prazo, induzidos pela programação metabólica. Alguns estudos avaliaram os efeitos de protocolos de treinamento de baixa e moderada intensidade nesses animais (DANTAS *et al.*, 2010; RINALDI *et al.*, 2014), enquanto que não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos de protocolos de HIIT nesse modelo de indução de sobrepeso/obesidade ou a comparação entre *endurance* moderado e HIIT. A utilização e comparação desses tipos de treinamento em modelos de sobrepeso/obesidade estão presentes na literatura utilizando dietas hipercalóricas e não em modelos de programação metabólica (HAFSTAD *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2015; WANG, NINGNING *et al.*, 2017). Ainda a destacar, poucos estudos analisaram os efeitos de protocolos de exercícios iniciados no desmame, o que seria importante para avaliar se o treinamento físico seria capaz de reverter as consequências da programação metabólica precocemente.

Dantas *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do treinamento de *endurance* crônico, em esteira, em ratos com sete semanas de vida e que foram submetidos à superalimentação na lactação por redução de ninhada. Como resultados constataram que o protocolo de exercício foi eficiente na redução da gordura visceral quando comparados com animais do grupo controle.

Rinaldi *et al.* (2014) estudaram os efeitos de dois protocolos de treinamento, de baixa e moderada intensidades em ratos superalimentados na lactação, do desmame aos cinquenta dias de vida, do desmame aos noventa

dias de vida e dos sessenta aos noventa dias de vida. Os autores observaram que os dois protocolos de treinamento foram eficientes na manutenção da homeostase glicêmica e na redução dos estoques de gordura, independentemente do período de início do treinamento.

Frankenfeld *et al.* (2016) investigaram os efeitos de um protocolo de treinamento de *endurance* em esteira em ratos submetidos ao protocolo de redução de ninhadas. O treinamento físico iniciou-se aos noventa dias de idade até cento e oitenta dias de idade. Como conclusão observaram que o treinamento físico de baixa intensidade atenuou algumas alterações metabólicas e hormonais de ratos machos adultos programados pela superalimentação neonatal, como os níveis séricos de corticosterona e leptina, peso corporal, adiposidade, ingestão de ração e pressão arterial sistólica, quando comparados com os animais sedentários, demonstrando ser um recurso importante no combate a doenças cardiovasculares e metabólicas.

Em virtude da escassez de estudos no papel de diferentes protocolos de exercícios físicos no modelo de programação metabólica por superalimentação durante a lactação, tal estudo foi proposto.

3. HIPÓTESE

Considerando os últimos resultados publicados apresentando maior efetividade do HIIT sobre o treinamento de *endurance* moderado em diversas variáveis, devido principalmente a alta intensidade de esforço, a hipótese do presente estudo é que HIIT acarretará adaptações estruturais, bioquímicas e metabólicas superiores ao treinamento de *endurance* moderado em ratos superalimentados durante a lactação quando comparados com os animais não exercitados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar, acompanhar e comparar as adaptações biométricas, bioquímicas e metabólicas em ratos Wistar machos e fêmeas superalimentados na lactação e submetidos ao treinamento de *endurance* moderado ou HIIT.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1 Acompanhar e comparar ratos Wistar machos e fêmeas superalimentados na fase de lactação treinados em *endurance* moderado ou HIIT, quanto a:

- a. Ganho de peso corporal e consumo alimentar semanais, além do peso corporal ao final do experimento.
- b. Adiposidade central, ao final do experimento, através do peso do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal
- c. Eficiência dos protocolos de treinamento de *endurance* e HIIT na aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máximo)
- d. Alterações no metabolismo glicêmico através do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)
- e. Metabolismo glicêmico (glicemia de jeum) e lipídico (colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos) através da bioquímica sorológica.
- f. Possíveis diferenças nas respostas aos protocolos de treinamentos *endurance* e HIIT.
- g. Possíveis diferenças entre os sexos nas respostas aos protocolos de indução de obesidade e de treinamentos físicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA/UFJF), sob protocolo 045/2015.

5.1. Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar, sendo quarenta machos e quarenta fêmeas, obtidos no biotério de produção do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (CIAEP 0100482013). No segundo dia pós-natal, os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo Ninhada Controle (NC; dez animais/ninhada) e Grupo Ninhada Reduzida (NR; quatro animais/ninhada) para, posteriormente ao desmame, comporem os grupos experimentais. A redução de ninhada foi realizada no segundo dia pós-natal, de acordo com Bei *et al.* (2015), assim como o remanejamento dos animais para a formação de ninhadas compostas exclusivamente por filhotes machos ou fêmeas. A formação das ninhadas, reduzidas e controles, foi realizada por técnicos do Biotério de Criação do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF. Os filhotes retirados durante a redução de ninhadas foram realocados para a formação de ninhadas controle, formadas por dez animais. Além disso, os filhotes não selecionados para o estudo foram distribuídos para outras ninhadas da colônia, a fim de evitarmos o descarte e aproveitá-los para a recomposição da colônia.

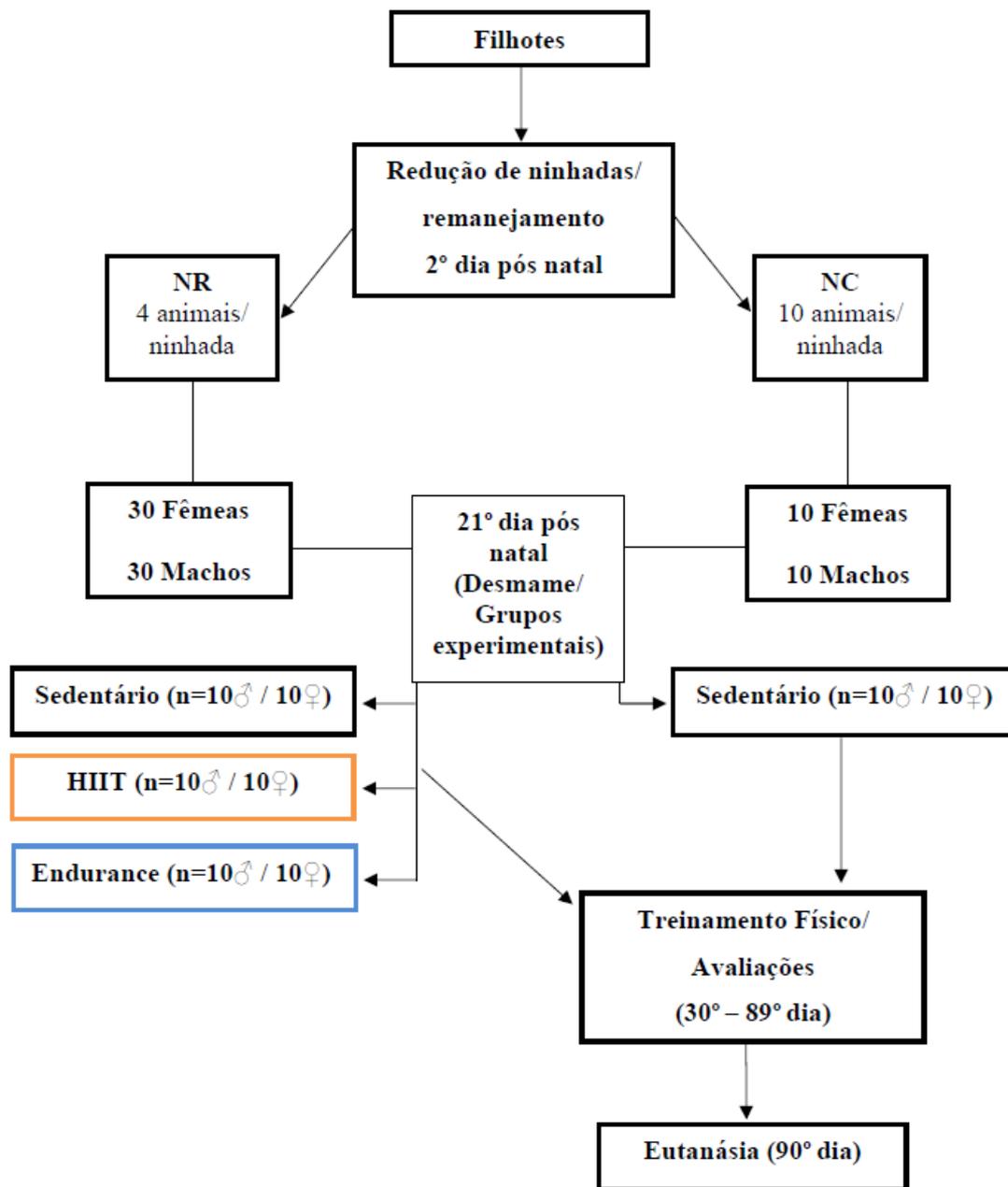
Os animais foram mantidos em prateleiras climatizadas ALESCO®, com fluxo de ar e em condições laboratoriais padrão, com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12h. Após o desmame (21º dia de

vida pós-natal) os animais foram alimentados com pellets de ração padrão NUVILAB CR1® (Nuvital Nutrientes Ltda. Colombo, Brasil) e água *ad libitum*.

5.2. Grupos experimentais

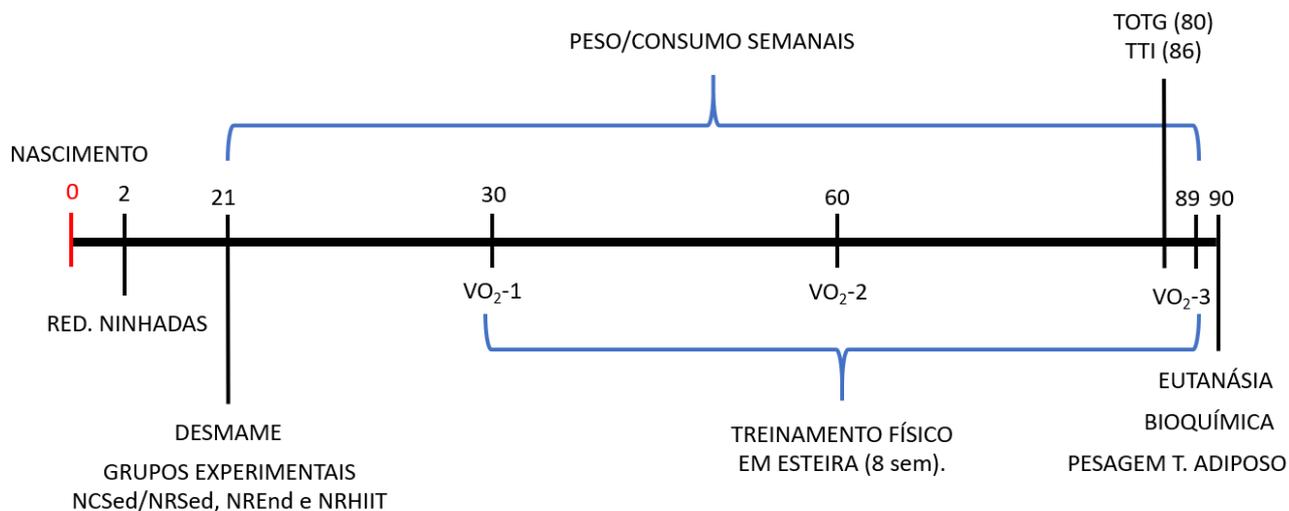
No desmame, os animais NR foram distribuídos por sorteio em três grupos experimentais: sedentário (NRSed), *endurance* (NREnd) e HIIT (NRHIIT), enquanto os animais NC foram agrupados em um grupo sedentário (NCSed). A Figura 2 apresenta o fluxograma para a formação dos grupos experimentais, enquanto a Figura 3 representa a linha do tempo do estudo.

Figura 2. Fluxograma do estudo.



NR: Grupo Ninhada Reduzida; NC: Grupo Ninhada Controle; HIIT: *high intensity interval training*.

Figura 3. Linha do tempo do estudo.



5.3. Testes da aptidão cardiorrespiratória (VO₂ máx.) e protocolos de treinamento

Imediatamente após o desmame, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira motorizada de seis baias (Insight[®] Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) por cinco dias, com períodos de dez minutos e com velocidades progressivas onde, posteriormente, foram treinados.

Antes, durante e após a realização dos protocolos de treinamento, todos os animais, inclusive os pertencentes aos grupos sedentários, foram submetidos a avaliação de capacidade cardiorrespiratória máxima (VO₂ máx.) em esteira metabólica (Panlab[®], Hollistone, EUA) com a utilização do analisador de gases (Harvard Apparatus[®], Hollistone, EUA). O protocolo envolveu corrida em esteira até a exaustão, a uma inclinação de 5°, iniciando a uma velocidade de 6m/min e aumentada em três metros/minuto a cada três minutos até que os animais estivessem inaptos a continuar o exercício (RODRIGUES *et al.*, 2007). O critério adotado e considerado para a interrupção

do teste foi a negação dos animais em continuar a corrida, com preferência em se manter sobre o aparato de estímulo aversivo.

Além do critério de avaliação da aptidão cardiorrespiratória e eficiência do treinamento, os resultados foram utilizados para o melhor ajuste na prescrição das cargas de treinamento, tornando-a mais individualizada e de acordo com a capacidade aeróbica de cada animal. Após quatro semanas de treinamento, os animais foram submetidos novamente ao teste de VO_2 máx. como objetivo de ajustar as cargas de treinamento e, ao final de mais quatro semanas, o teste foi realizado novamente.

Após a formação dos grupos experimentais, dois protocolos de treinamento físico foram utilizados: *endurance* e HIIT.

O protocolo de *endurance* teve como característica a intensidade moderada (65-70% do VO_2 máx), com três sessões semanais, sessenta minutos por sessão, durante oito semanas. Cada sessão de treinamento consistia em dez minutos para aquecimento (50% VO_2 máx.) e cinquenta minutos para a parte principal (65-70% do VO_2 máx.). O ajuste da carga de treinamento foi realizado na quarta semana de treinamento, após uma nova avaliação do VO_2 máx.

As sessões de HIIT tiveram duração de quarenta minutos, divididos em dez minutos para aquecimento (50% VO_2 máx.) e seis períodos de três minutos de corrida de alta intensidade (85-90% do VO_2 máx.) intercalados com períodos de dois minutos de corrida de baixa intensidade (50% VO_2 máx.), totalizando trinta minutos para a parte principal. O ajuste da carga de treinamento foi realizado após as primeiras quatro semanas de treinamento, após uma nova avaliação do VO_2 máx. Todos os protocolos de treinamento se iniciaram após o

período de adaptação e o primeiro teste de VO_2 máx., em torno do 30º dia pós-natal.

5.4. Massa corporal, adiposidade central, consumo de ração e pesagem dos órgãos

O peso corporal dos animais NC e NR foi registrado semanalmente a partir do quarto dia pós-natal até o 90º dia de vida. O índice de Lee, para avaliação de obesidade, foi calculado pela fórmula $[IL = (MC \times 1/3) / CNA \times 100]$, onde MC = massa corporal (g); CNA= comprimento nasoanal (CNA) (cm). O consumo alimentar também foi obtido semanalmente pela diferença entre a quantidade de alimento ofertada e a remanescente, vinte e quatro horas após o fornecimento.

Os animais foram eutanasiados por ruptura diafragmática após anestesia. 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 miorelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg (Kensol®, Konig, Brasil). Os dois fármacos foram misturados e aplicados unicamente pela via intraperitoneal (LLOYD; WOLFENSOHN, 1996). Após exsanguinação total por punção cardíaca sob anestesia geral, o sangue coletado foi centrifugado e o soro armazenado a -80°C. Imediatamente após a eutanásia, o tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal foram retirados e pesados em balança de precisão (Bioprecisa®- especificidade 0,0001g - Brasil).

A extração do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal foi realizada para a quantificação da adiposidade central dos grupos experimentais.

5.5. Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Para a realização de ambos os testes, os animais foram submetidos ao jejum alimentar no período de seis horas. O sangue foi coletado através do lancetamento da cauda dos animais para aferição de glicemia capilar, analisadas em glicosímetro AccuChek Advanced (Roche®, Germany).

No TOTG, a glicemia basal (T0) foi mensurada e, posteriormente, foi administrado 2g/kg de peso corporal de solução de glicose a 50%, via gavagem. Amostras subsequentes de sangue foram coletadas nos tempos T1 (15'), T2 (30'), T3 (60') e T4 (120'). A área total sob a curva de TOTG foi calculada (SILVA *et al.*, 2015).

No TTI os animais receberam infusão intraperitoneal de insulina (1U / Kg de peso corporal) e amostras de sangue foram coletadas antes (T0') da administração de insulina e, subsequentemente, nos tempos T1 (5'), T2 (15'), T3 (30') e T4 (45') após a administração. A constante de decaimento da glicose plasmática (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $0,693/(t_{1/2})$, onde $t_{1/2}$ é calculado a partir da inclinação da menor análise quadrática das concentrações plasmáticas da glicose após a injeção de insulina (ANDREAZZI *et al.*, 2009).

5.6. Análises bioquímicas

A análise bioquímica foi realizada no aparelho automatizado CobaS c111 (Roche®) e kits Cobas c111 para a dosagens séricas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose.

5.10. Análise estatística

Inicialmente foi realizado o teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para verificarmos possíveis alterações nos animais NR, foram realizadas comparações entre os grupos NCSed com seus respectivos grupos NRSed, utilizando os testes de t de Student. Para possíveis interações entre sexo e tipo de treinamento, foi utilizado ANOVA *two way*, enquanto o ANOVA *one way* seguido do post hoc de Tukey foi utilizado para as comparações intragrupos de animais NR machos e fêmeas, separadamente. Para a obtenção dos resultados do TOTG, a área total sob a curva glicêmica foi calculada. Os resultados são expressos como média \pm DP (desvio padrão) e nível de significância adotado $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc[®], versão 21) e GraphPad Prism[®] 5.0 (San Diego, EUA).

6. RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de artigo de acordo com o regimento do Programa de Pós-Graduação em Saúde. O trabalho resultou em artigo original publicado na **Diabetology & Metabolic Syndrome** (Qualis B1/fator de impacto 2,413) (Apêndice A), em artigo original submetido e aceito para publicação no **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** (Qualis B1/fator de impacto 2,21) (Apêndice B), resumos apresentados em eventos científicos (Apêndice C), além de uma tabela apresentando os resultados das comparações intra e intergrupos, em valores numéricos, referentes à capacidade cardiorrespiratória máxima (VO_2 máx.) (Apêndice D).

Artigo 1 - “Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats “publicado no periódico “Diabetology & Metabolic Syndrome (Qualis B1/fator de impacto 2,413).

de Lade et al. *Diabetol Metab Syndr* (2018) 10:70
<https://doi.org/10.1186/s13098-018-0374-x>

Diabetology &
 Metabolic Syndrome

RESEARCH

Open Access



Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats

Carlos Gabriel de Lade^{1,2*}, Ana Eliza Andreazzi^{1,2}, Mariana Bolotari^{1,2}, Vinícius Moreira Gonçalves Costa^{1,2}, Vera Maria Peters^{1,2} and Martha de Oliveira Guerra^{1,2}

Abstract

Background: Obesity is associated with several comorbidities, such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, and may have its origin in early life stages, such as in the lactation period, through metabolic programming. Physical activity aids in decreasing the chances of developing cardiovascular and metabolic diseases, even with small weight losses and, in children, can play an essential role in preventing weight gain and other health problems. The present study aimed to evaluate the effects of moderate intensity endurance training and high intensity interval training (HIIT) protocols on obesity-related parameters and cardiorespiratory capacity in overfed Wistar rats throughout the breastfeeding period.

Methods: Two days after birth, forty male and female Wistar rats were clustered into two groups: Control Litter Group (CL; ten animals/litter) and Reduced Litter Group (RL; four animals/litter). At weaning, RL animals were distributed randomly into three experimental groups: sedentary, moderate intensity endurance training and HIIT, while CL animals were clustered into a sedentary group.

Results: RL male and female body weight, before weaning, was significantly higher when compared with CL animals. This difference was maintained between CLSed and RLSed groups after weaning during all assessed periods. Adiposity was significantly higher in RLSed males when compared to CLSed males, and alterations in glycaemic metabolism were also observed. Endurance and HIIT protocols were efficient in improving maximal cardiorespiratory capacity, as well as concerning the glycaemic metabolism and central fat accumulation of males and females submitted to childhood overfeeding by the litter reduction method.

Conclusions: Both moderate endurance training and HIIT protocols included in early life were efficient in reverting or preventing certain metabolic alterations as a consequence of overfeeding during breastfeeding in male and female Wistar rats.

Keywords: Childhood obesity, Obesity management, Insulin resistance, Glucose intolerance, Aerobic exercise, High-intensity interval training, Rats

*Correspondence: lade.gab@gmail.com

¹ Reproductive Biology Center, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n. Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Artigo 2 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

O artigo intitulado “**EFFECT OF POST-NATAL OVERFEEDING ON THE MALE AND FEMALE WISTAR RAT REPRODUCTIVE PARAMETERS**” foi aceito para publicação pelo Journal of Developmental Origins of Health and Disease (Qualis B1/fator de impacto 2,21).

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

¹ Reproductive Biology Center, 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.

----- Mensagem encaminhada -----

De: Journal of Developmental Origins of Health and Disease <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Data: seg, 18 de fev de 2019 às 14:19

Assunto: Journal of Developmental Origins of Health and Disease - Decision on Manuscript ID DOHaD-12-18-OA-1080.R1

Para: <vini.mgcosta@gmail.com>

Cc: <t.plosch@umcg.nl>

18-Feb-2019

Dear Mr. Costa:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EFFECT OF POST-NATAL OVERFEEDING ON THE MALE AND FEMALE WISTAR RAT REPRODUCTIVE PARAMETERS" for publication in the Journal of Developmental Origins of Health and Disease. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter. Before we forward your files to production please incorporate the minor changes requested and upload final files.

Please include a brief commentary on how you addressed the comments of the reviewers.

ScholarOne Manuscripts™ Vinicius Costa ▾ Instructions & Forms Help Log Out

Journal of Developmental Origins of Health and Disease 

[Home](#) [Author](#) [Review](#)

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- 3 Manuscripts with Decisions >**
- Start New Submission >
- 5 Most Recent E-mails >

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
a revision has been submitted (DOHaD-12-18-OA-1080.R2)	ADM: Dennis, Valerie	DOHaD-12-18-OA-1080.R1	EFFECT OF POST-NATAL OVERFEEDING ON THE MALE AND FEMALE WISTAR RAT REPRODUCTIVE PARAMETERS View Submission	28-Jan-2019	18-Feb-2019
	<ul style="list-style-type: none"> • Accept - Subject to Minor Corrections (18-Feb-2019) • a revision has been submitted 				
view decision letter					

RESUMOS

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 Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACYTAL).

15/11/2016 – 19/11/2016

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS MODELOS PARA INDUÇÃO DE OBESIDADE EM CRIAS DE RATAS WISTAR.

Carlos Gabriel de Lade¹, Vera Maria Peters¹, Marcella Martins Terra¹, Ana Eliza Andreazzi², Martha de Oliveira Guerra¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora. ²Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Email: lade.gab@gmail.com

14º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. 04/05/2018 – 06/05/2016

EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO DURANTE A LACTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROMOTOR DE MACHOS WISTAR.

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

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

XXXII Reunião Anual da FeSBE. 03/09/2017 – 06/09/2017

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 FeSBE. 03/09/2017 – 06/09/2017

APLICABILIDADE DO TESTE DE VO₂ MÁX. PARA AJUSTE DE CARGAS DE TREINAMENTO PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO.

¹Tamiris Schaeffer Fontoura, ¹Carlos Gabriel de Lade, ¹Mariana Bolotari,
¹Vinicius Moreira Gonçalves Costa, ¹Ana Eliza Andreazzi, ¹Vera Maria Peters,
¹Martha de Oliveira Guerra.

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

15º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.
16/06/2018 – 19/06/2018

DIFERENÇAS BIOQUÍMICAS EM DOIS MODELOS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE POR MODIFICAÇÃO DO PADRÃO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR

Oshio LT¹, Bolotari M¹, Lopes JF¹, Costa VMG¹, Lade CG¹, Sá JP¹, Andreazzi
AE¹, Guerra MO¹, Peters VM¹

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

15º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.
16/06/2018 – 19/06/2018

7. COMENTÁRIOS GERAIS

O protocolo de redução de ninhadas utilizado para o aumento do peso corporal dos animais utilizados no experimento foi eficaz em alterar parâmetros biométricos e bioquímicos, mesmo esses animais sendo alimentados com ração padrão para animais de experimentação após o desmame. A massa corporal dos machos NR antes do desmame foi significativamente superior a partir do 4º dia de vida quando comparados com os animais NC, sendo esse padrão mantido após o desmame em todos os períodos avaliados. Já nas fêmeas, essa diferença ocorreu a partir do 10º dia pós-natal permanecendo até o 21º dia, padrão que se manteve em todos os pontos avaliados após o desmame. Após o desmame, os animais apresentaram-se hiperfágicos, representado pelo maior consumo de ração em vários pontos de avaliação.

Com relação à massa corporal, tanto os machos quanto as fêmeas dos grupos NR apresentaram valores significativamente superiores quando comparados com seus respectivos grupos NC, porém não houve diferenças no CNA e Índice de Lee. A adiposidade, representada pelos pesos relativos do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, foi significativamente superior nos machos NR quando comparados com os machos NC, com médias 26% e 58% superiores, respectivamente. Já nas fêmeas, houve diferença significativa no peso relativo do tecido adiposo perigonadal, com o grupo NR apresentando média 45% superior quando comparado com o grupo NC. Apesar de não apresentar diferença significativa no peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal de fêmeas, a média do grupo NR foi 31% superior quando comparada com a média do grupo NC.

A comparação da bioquímica sorológica de machos NC e NR mostrou diferença estatisticamente significativa na glicose sérica, com o grupo NR apresentando média 14% superior. Além disso, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, as médias de colesterol total e triglicerídeos do grupo NRSed foram 36% e 10% superiores quando comparadas com as médias dos grupos NC, respectivamente.

A média da área sob a curva no TOTG dos machos NR foi 11,2% superior em comparação com os resultados dos animais NC e 9% superior em comparação com o grupo NC nas fêmeas NR, significando maior intolerância à glicose nos animais NR. Os machos NR apresentaram média da constante de decaimento de glicose (k_{itt}) 39% menor quando comparados com a média do grupo NC no TTI, mostrando maior resistência à insulina no grupo superalimentado. Já nas fêmeas, não houve diferença na média da K_{itt} entre os grupos NC e NR.

Em relação à capacidade cardiorrespiratória, os grupos treinados em *endurance* e HIIT apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos resultados do terceiro teste para o primeiro teste, tanto nos machos quanto nas fêmeas, mostrando eficiência dos dois protocolos de treinamento no aumento da capacidade cardiorrespiratória dos animais treinados. Essas diferenças representaram aumento de 29% no grupo NREnd e de 21% no grupo NRHIIT, nos machos. O mesmo comportamento foi observado nos grupos treinados de fêmeas, com aumento de 24% e 18% nos grupos NREnd e NRHIIT, respectivamente. Já nos grupos sedentários, houve queda no VO_2 máx. de 30% e 19% nos grupos NRSed de machos e fêmeas, respectivamente.

As comparações dos resultados do último teste de VO_2 máx. entre os três grupos de machos e entre os grupos de fêmeas não mostraram diferenças estatisticamente significativas nas médias dos animais treinados em *endurance* e HIIT. Entretanto, o grupo NREnd de machos apresentou VO_2 máx. 61% maior que o apresentado pelo grupo NRSed, enquanto que no grupo NRHIIT a diferença para o grupo NRSed foi de 59%. O mesmo comportamento foi observado nas fêmeas, com o grupo NREnd e NRHIIT apresentando resultados 47% e 39% superiores quando comparados com o grupo NRSed, respectivamente.

Entre os grupos de machos, não houveram diferenças estatisticamente significativas na massa corporal final, assim como no CNA e Índice de Lee. Entretanto, diferenças ocorreram na adiposidade. O grupo NRSed apresentou médias superiores no peso relativo do tecido adiposo perigonadal em relação aos grupos NREnd (20%) e NRHIIT (19%) e também no tecido adiposo retroperitoneal em relação aos dois grupos treinados, com diferenças de 38% (NREnd) e 32% (NRHIIT). As fêmeas do grupo NRSed apresentaram média da massa corporal final estatisticamente superior aos grupos NREnd (12%) e NRHIIT (13%). Além da diferença na massa corporal, o grupo NRSed apresentou peso relativo do tecido perigonadal estatisticamente superior à média do grupo NRHIIT (51%) e no tecido retroperitoneal em relação ao grupo NREnd (34%). Não foram observadas diferenças no CNA e Índice de Lee entre os grupos de fêmeas NR. Nossos resultados demonstram que os dois protocolos de treinamento utilizados foram eficazes no aumento da aptidão cardiorrespiratória e na diminuição da adiposidade central tanto em machos quanto fêmeas.

A análise da bioquímica sorológica dos machos NR mostrou que o grupo NRSed apresentou média da glicose sérica 14% e 18% superior aos grupos NREnd e NRHIIT, respectivamente. Já nas fêmeas, o grupo NRSed obteve média de glicose sérica estatisticamente superior ao grupo NREnd (11%). Apesar de não mostrar diferença estatística, o grupo NRSed apresentou média 8% superior ao grupo NRHIIT. A análise dos resultados do TOTG nos animais NR demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas, tanto nos machos quanto nas fêmeas, dos grupos treinados em *endurance* e HIIT quando comparados com os grupos NRSed. Entretanto, nos machos, o grupo NRSed apresentou valores inferiores na constante de decaimento de glicose (K_{itt}) durante o TTI quando comparado tanto com o grupo NREnd (51%) quanto com o grupo NRHIIT (60%), demonstrando maior resistência à insulina nos animais NR sedentários do que os grupos treinados em *endurance* e HIIT. Porém, nas fêmeas o grupo NRHIIT obteve média da K_{itt} superior ao grupo NRSed (32%) e NREnd (30%), ou seja, o HIIT foi mais eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina nas fêmeas NR quando comparado com o treinamento de *endurance*.

Com isso, de maneira geral, a comparação entre os dois protocolos de treinamento utilizados no experimento não mostrou diferença entre ambos quando levamos em consideração ao aumento da capacidade cardiorrespiratória, diminuição da adiposidade central e melhora do metabolismo glicêmico. Em relação às possíveis diferenças nas respostas aos protocolos de treinamento entre os machos e fêmeas, não foram encontradas distinções nessas respostas, confirmando a eficiência e aplicabilidade dos

protocolos de *endurance* moderado e HIIT para os objetivos propostos para ambos os sexos.

Nosso estudo torna-se relevante pois, ao contrário de estudos experimentais envolvendo alterações metabólicas e exercícios físicos, os animais foram submetidos aos protocolos de treinamento de forma precoce, ou seja, logo após o desmame. Os resultados mostraram que os protocolos de *endurance* moderado e Hiit adotados foram eficazes em melhorar algumas condições consequentes da superalimentação na lactação, principalmente em parâmetros do metabolismo glicêmico e prevenção do aumento da gordura central.

Mesmo em indivíduos alimentados inadequadamente num período importante para o desenvolvimento e, conseqüentemente, com riscos mais elevados de alterações metabólicas, podem se beneficiar da prática regular de exercícios físicos já na infância. Nossos resultados podem auxiliar na elaboração de programas de exercícios físicos como parte do tratamento não medicamentoso na prevenção/perda de peso corporal e melhora metabólica em crianças com sobrepeso/obesidade precoce e na diminuição dos riscos de doenças cardiometabólicas na idade adulta.

Porém, mais estudos envolvendo o modelo de redução de ninhadas e diferentes protocolos de exercícios físicos, como tipo, duração, intensidade e frequência semanal são necessários para a compreendermos melhor a influência do exercício físico sobre indivíduos que apresentem alterações precoces no peso corporal e nas possíveis alterações metabólicas a longo prazo.

8. CONCLUSÃO

Os protocolos de treinamento de *endurance* de intensidade moderada e treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) foram eficazes em prevenir e reverter alterações metabólicas, principalmente relacionadas ao metabolismo glicêmico e adiposidade central, além do aumento do VO_2 máx. dos animais sem diferenças entre eles. Além disso, verificamos a ausência de diferenças das respostas, entre os sexos, aos dois protocolos de treinamento.

Com isso, concluímos que tanto o protocolo de *endurance* moderado quanto HIIT inseridos na infância foram eficientes em reverter, prevenir e melhorar algumas alterações metabólicas em consequência da superalimentação na lactação em ratos Wistar de ambos os sexos.

9. REFERÊNCIAS

ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO. **4.ed. - São Paulo, SP.** p. 1–188 , 2016.

AKRAM, D. S. *et al.* Obesity: Preventing and managing the global epidemic. **World Health Organization - Technical Report Series** n. 894, 2000.

AL-ZAHRANI, S. S. Effect of diet control and exercise on the lipid profile of obese men. **International Journal of Research in Medical Sciences** v. 2, n. 1, p. 95, 2014.

ALLCOCK, D. M.; GARDNER, M. J.; SOWERS, J. R. Relation between Childhood Obesity and Adult Cardiovascular Risk. **International Journal of Pediatric Endocrinology** v. 2009, n. Cdc, p. 1–4, 2009.

ANDAKI, A. C. R. *et al.* Different waist circumference measurements and prediction of cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in children. **Obesity Research & Clinical Practice** v. 6, n. 2, p. e149–e157, 2012.

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** v. 201, n. 3, p. 351–359, 2009.

ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: Consequences of exposure to an energy rich diet during development. **Journal of Physiology** v. 565, n. 1, p. 3–8, 2005.

AUCOUTURIER, J. *et al.* Effect of android to gynoid fat ratio on insulin resistance in obese youth. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine** v. 163, n. 9, p. 826–831, 2009.

BACON, A. P. *et al.* VO₂max Trainability and High Intensity Interval Training in Humans: A Meta-Analysis. **PLoS ONE** v. 8, n. 9, 2013.

- BAKER, J. L. *et al.* Maternal prepregnant body mass index, duration of breastfeeding, and timing of complementary food introduction are associated with infant weight gain. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 80, n. 6, p. 1579–1588, 2004.
- 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** v. 14, n. 1, p. 96, 2015.
- BELL, A. C.; GE, K.; POPKIN, B. M. Weight gain and its predictors in Chinese adults. **International Journal of Obesity** v. 25, n. 7, p. 1079–1086, 2001.
- BELL, A. C.; GE, K.; POPKIN, B. M. The road to obesity or the path to prevention: Motorized transportation and obesity in China. **Obesity Research** v. 10, n. 4, p. 277–283, 2002.
- BETTIOL, H. *et al.* Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults? **Brazilian journal of medical and biological research** v. 40, n. 9, p. 1237–1243, 2007.
- BHUPATHIRAJU, S. N.; HU, F. B. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. **Circulation Research** v. 118, n. 11, p. 1723–1735, 2016.
- BIRO, F. M. *et al.* Influence of obesity on timing of puberty. **International Journal of Andrology** v. 29, n. 1, p. 272–277, 2006.
- BLOOM, D. E. *et al.* The Economic Burden of Chronic Diseases: Estimates and Projections for China, Japan, and South Korea. **NBER Working Paper Series** v. 23601, p. 30, 2017.
- BLUNDELL, J. E. Perspective on the central control of appetite. **Obesity (Silver**

Spring, Md.) v. 14 Suppl 4, n. July, p. 160S–163S, 2006.

BOUBRED, F. *et al.* Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. **AJP: Renal Physiology** v. 293, n. 6, p. F1944–F1949, 2007.

BOUBRED, F. *et al.* Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. **American Journal of Physiology Renal Physiology** v. 297, n. 4, p. F943-951, 2009.

BOULLU-CIOCCA, S. *et al.* Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes** v. 54, n. 1, p. 197–203, 2005.

BRAY, G. A. Medical consequences of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 89, n. 6, p. 2583–2589, 2004.

BRENSEKE, B. *et al.* Current Thoughts on Maternal Nutrition and Fetal Programming of the Metabolic Syndrome. **Journal of Pregnancy** v. 2013, p. 1–13, 2013.

BURGOMASTER, K. A. *et al.* Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. **Journal of Applied Physiology** v. 98, n. 6, p. 1985–1990, 2005.

CABLER, S. *et al.* Obesity: modern man's fertility nemesis. **Asian Journal of Andrology** v. 12, p. 480–489, 2010.

CASTRO, A. V. B. *et al.* Obesity, insulin resistance and comorbidities ? Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** v. 58, n. 6, p. 600–609, 2014.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O.. Modelos experimentais de

resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** v. 50, n. 2, p. 190–197, 2006.

CIOLAC, E. G. *et al.* Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension. **Hypertension Research** v. 33, n. 8, p. 836–843, 2010.

COLLDEN, G. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. **Molecular Metabolism** v. 4, n. 1, p. 15–24, 2015.

CONTRERAS, C. *et al.* Effects of Neonatal Programming on Hypothalamic Mechanisms Controlling Energy Balance. **Hormone and Metabolic Research** v. 45, n. 13, p. 935-944, 2013.

CORTE DE ARAUJO, A. C. *et al.* Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. **PLoS ONE** v. 7, n. 8, p. 1–8, 2012.

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.

DANTAS, E. M. *et al.* Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 43, n. 5, p. 515–521, 2010.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D.. The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clinical Chemistry** v. 54, n. 6, p. 945–955, 2008.

DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C. F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Bioscience Reports** v. 25, n. 3–4, p.

251–269, 2005.

DESPRES, J. P. Excess visceral adipose tissue/ectopic fat: The missing link in the obesity paradox? **Journal of the American College of Cardiology** v. 57, n. 19, p. 1887–1889, 2011.

DEWEY, K. G. *et al.* Community and international nutrition: Effects of exclusive breastfeeding for four versus six months on maternal nutritional status and infant motor development: Results of two randomized trials in Honduras. **Journal of Nutrition** v. 131, n. 2, p. 262–267, 2001.

DI MEO, S.; IOSSA, S.; VENDITTI, P. Skeletal muscle insulin resistance: Role of mitochondria and other ROS sources. **Journal of Endocrinology** v. 233, n. 1, p. R15–R42, 2017.

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.

DROLET, R. *et al.* Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. **Obesity** v. 17, n. 3, p. 424–430, 2009.

EKNOYAN, G. A History of Obesity, or How What Was Good Became Ugly and Then Bad. **Advances in Chronic Kidney Disease** v. 13, n. 4, p. 421–427, 2006.

FERNANDEZ, M. L. *et al.* Beneficial effects of weight loss on plasma apolipoproteins in postmenopausal women. **The Journal of nutritional biochemistry** v. 15, n. 12, p. 717–721, 2004.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal of Internal Medicine** v. 262, n. 4, p. 408–414, 2007.

FISHER, G. *et al.* High intensity interval- vs moderate intensity- training for improving cardiometabolic health in overweight or obese males: A Randomized controlled trial. **PLoS ONE** v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.

FOSTER, C. *et al.* Physical activity and family-based obesity treatment: a review of expert recommendations on physical activity in youth. **Clinical Obesity** Physical activity and family-based obesity treatment: a review of expert recommendations on physical activity in youth. **Clinical Obesity**, 2017.v.1, n. 1, p. 68-79, 2017.

FRANKENFELD, S. P. *et al.* Efeitos do treinamento em esteira em ratos adultos obesos programados pela superalimentação pós-natal. **Arquivos em Movimento** v. 12, n. 1, p. 65-90, 2016.

FRIDLAND, L E; PHILIPSON, L H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. **Diabetes, obesity & metabolism** v. 8, n. 2, p. 136–145, 2006.

GARCÍA-HERMOSO, A. *et al.* Is high-intensity interval training more effective on improving cardiometabolic risk and aerobic capacity than other forms of exercise in overweight and obese youth? A meta-analysis. **Obesity Reviews** v. 17, n. 6, p. 531–540, 2016.1467-7881.

GASTALDELLI, A.; GAGGINI, M.; DEFRONZO, R. A. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: Results from the San Antonio metabolism study. **Diabetes** v. 66, n. 4, p. 815–822, 2017.

GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Adiponectin : Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. v. 6, n. 1, p. 151–166, 2015.

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.
- GIBALA, M. J.; MCGEE, S. L. Metabolic Adaptations to Short-term High-Intensity Interval Training. **Exercise and Sport Sciences Reviews** v. 36, n. 2, p. 58–63, 2008.
- GILLMAN, M. W. Risk of Overweight Among Adolescents Who Were Breastfed as Infants. **Jama** v. 285, n. 19, p. 2461-2467, 2001.
- GLAVAS, M. M. *et al.* Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. **Endocrinology** v. 151, n. 4, p. 1598–1610, 2010.
- GLOBAL BMI MORTALITY COLLABORATION. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. **The Lancet** v. 388, n. 10046, p. 776–786, 2016.
- GOMES-NETO, M. *et al.* High-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on exercise capacity and quality of life in patients with coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology** v.24, n.16, p. 1696-1707, 2017.
- GOODPASTER, B. H. *et al.* Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. **Archives of Internal Medicine** v. 165, n. 7, p. 777–783, 2005.
- GOODPASTER, B. H.; KRISHNASWAMI, S.; HARRIS, T. B. Tissue Distribution and Both Type 2 Diabetes and Impaired Glucose. **Diabetes Care** v. 26, n. 2, p. 372–379, 2003.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Research** v. 48, n. 9, p. 1905–1914, 2007.

HABBOU, A. *et al.* Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences.

Journal of Nutrition v. 143, n. 5, p. 553–562, 2013.

HABBOU, A. *et al.* Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. **Biochimie** v. 94, n. 1, p. 117–124, 2012.

HAFSTAD, A. D. *et al.* High- And moderate-Intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-Induced obesity. **Diabetes** v. 62, n. 7, p. 2287–2294, 2013.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. **British Medical Bulletin** v. 60, n. 1, p. 5–20, 2001.

HARDER, T. *et al.* Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. **American Journal of Epidemiology** v. 165, n. 8, p. 849–857, 2007.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **Lancet** v. 366, n. 9492, p. 1197–1209, 2005.

HOLLAND, W. L. *et al.* Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. **Journal of Clinical Investigation** v. 121, n. 5, p. 1858–1870, 2011.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture.

Pharmacoeconomics v. 33, n. 7, p. 673–689, 2016.

ITEM, F.; KONRAD, D. Visceral fat and metabolic inflammation: The portal theory revisited. **Obesity Reviews** v. 13, n. SUPPL.2, p. 30–39, 2012.

JAYANTHI, R *et al.* Associations among Insulin Resistance, Triacylglycerol/High Density Lipoprotein (TAG/HDL ratio) and Thyroid hormone

levels—A study on Type 2 diabetes mellitus in obese and overweight subjects.

Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews v. 11, p. S121–S126, 2017.

JELLEYMAN, C. *et al.* The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: A meta-analysis. **Obesity Reviews** v. 16, n. 11, p. 942–961, 2015.1467-7881.

JENSEN, M. D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 93, n. 11 (SUPPL. 1), p. 57–63, 2008.

JENSEN, T. K. *et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertility and Sterility** v. 82, n. 4, p. 863–870, 2004.

JIANG, X. *et al.* Early life factors and type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research** v. 2013, n. 1, p. 485082, 2013.

JO, J. *et al.* Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Computational Biology** v. 5, n. 3, 2009.

KANG, P. *et al.* Mechanisms of obesity-associated insulin resistance : many choices on the menu. **Genes & Development** v. 36, n. 215, p. 490–499, 2010.

KATZMARZYK, P. T. *et al.* An evolving scientific basis for the prevention and treatment of pediatric obesity. **International Journal of Obesity** v. 38, n. 7, p. 887–905, 2014.

KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S.; PATE, R. R. Effects of exercise on BMI z-score in overweight and obese children and adolescents: A systematic review with meta-analysis. **BMC Pediatrics** v. 14, n. 1, p. 1–16, 2014.

KIRCHNER, H. *et al.* Epigenetic flexibility in metabolic regulation: Disease

cause and prevention? **Trends in Cell Biology** v. 23, n. 5, p. 203–209, 2013.

KNITTLE, J. L.; HIRSCH, J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. **Journal of Clinical**

Investigation v. 47, n. 9, p. 2091–2098, 1968.

KONG, Z. *et al.* Comparison of high-intensity interval training and moderate-to-vigorous continuous training for cardiometabolic health and exercise enjoyment in obese young women: A randomized controlled trial. **PLoS ONE** v. 11, n. 7, p. 1–16, 2016.

KOPP, H.P. Impact of Weight Loss on Inflammatory Proteins and Their Association With the Insulin Resistance Syndrome in Morbidly Obese Patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 23, n. 6, p. 1042–1047, 2003.

LEITE, R. D. *et al.* Muscle endothelial-dependent microvascular dysfunction in adulthood due to early postnatal overnutrition. **Microvascular Research** v. 84, n. 1, p. 94–98, 2012.

LIM, S. S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet** v. 380, n. 9859, p. 2224–2260, 2012.

LITTLE, J. P. *et al.* A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: Potential mechanisms. **Journal of Physiology** v. 588, n. 6, p. 1011–1022, 2010.

LLOYD, M. H.; WOLFENSOHN, S. E. Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. **Lloydia (Cincinnati)** n. Orleans, p. 48–53, 1996.

LÓPEZ-SOLDADO, I. MUNILLA, M. A.; HERRERA, E. Long-term consequences of under-nutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. **British Journal of Nutrition** v. 96, n. 6, p. 1030–1037, 2006.

LÓPEZ, M. *et al.* Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. **International Journal of Obesity** v. 31, n. 2, p. 371–377, 2007.

LOZANO, R. *et al.* Progress towards Millennium Development Goals 4 and 5 on maternal and child mortality: An updated systematic analysis. **The Lancet** v. 378, n. 9797, p. 1139–1165, 2011.

LUCAS, E. Epigenetic effects on the embryo as a result of periconceptional environment and assisted reproduction technology. **Reproductive BioMedicine Online** v. 27, n. 5, p. 477–485, 2013.

MAEDA, K.; SHIMOMURA, I.; MIZUNO, K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. **Gene** v. 190, p. 1–9, 1997.

MANDÒ, C. *et al.* Sex specific adaptations in placental biometry of overweight and obese women. **Placenta** v. 38, p. 1–7, 2016.

MATSUZAWA, Y. The role of fat topology in the risk of disease. **International Journal of Obesity** v. 32, n. July, p. S83–S92, 2008.

MATSUZAWA, Y. Obesity And Metabolic Syndrome: The Contribution Of Visceral Fat And Adiponectin. **Diabetes Management** v. 4, n. 4, p. 391–401, 2014.

MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; NAKAMURA, T. The Concept of Metabolic Syndrome: Contribution of Visceral Fat Accumulation and Its Molecular Mechanism. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** v. 18, n. 8, p. 629–

639, 2011.

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.

MILLARD-STAFFORD, M. *et al.* Is Physical Fitness Associated with Health in Overweight and Obese Youth? A Systematic Review. **Kinesiology Review** v.

2, n. 4, p. 233–247, 2013.

MONDA, K. L. *et al.* Longitudinal relationships between occupational and domestic physical activity patterns and body weight in China. **European**

Journal of Clinical Nutrition v. 62, n. 11, p. 1318–1325, 2008.

MOREIRA, O. C. *et al.* Fatores de risco de doença cardiovascular em técnicos administrativos da universidade federal de viçosa. **Bioscience Journal** v. 25, n.

5, p. 133–140, 2009.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2010. **The Lancet** v. 380, n. 9859, p. 2197–2223, 2012.

NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. Inflamed fat: what starts the fire? **The Journal of Clinical Investigation** v. 116, n. 1, p. 32–35, 2006.

NG, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the

Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet** v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

NIELSEN, T. S. *et al.* Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. **Journal of Molecular Endocrinology**

v. 52, n. 3, 2014.

NYBO, L. *et al.* High-intensity training versus traditional exercise interventions for promoting health. **Medicine and Science in Sports and Exercise** v. 42, n. 10, p. 1951–1958, 2010.

O'REILLY, J. R.; REYNOLDS, R. M. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. **Clinical Endocrinology** v. 78, n. 1, p. 9–16, 2013.

OROZCO-SOLÍS, R. *et al.* Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. **PLoS ONE** v. 5, n. 10, 2010.

PAES, S. T. *et al.* Childhood obesity: A (re) programming disease? **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** v. 7, n. 3, p. 231–236, 2016.

PALMER, N. O. *et al.* Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. **Spermatogenesis** v. 2, n. 4, p. 253–263, 2012.

PAPAS, M. A. *et al.* The Built Environment and Obesity. v. 29, n. 27, p. 129–143, 2007.

PARK, M. H. *et al.* The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: A systematic review. **Obesity Reviews** v. 13, n. 11, p. 985–1000, 2012.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism** v. 58, n. SUPPL. 2, p. 18–28, 2011.

PEARSON, T. *et al.* The Effects of Insulin Resistance on Individual Tissues: An Application of a Mathematical Model of Metabolism in Humans. **Bulletin of Mathematical Biology** v. 78, n. 6, p. 1189–1217, 2016.

PINHO, C. P. S. *et al.* Prevalência de excesso de peso e obesidade e fatores

associados, Brasil, 2006. **Cad. Saúde Pública** v. 43, n. 2, p. 83–89, 2013.

PLAGEMANN, A. *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Physiology** v. 587, n. 20, p. 4963–4976, 2009.

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.

POIRIER, P. *et al.* Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on obesity and heart disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. **Circulation** v. 113, n. 6, p. 898–918, 2006.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. **Nutr Rev** v. 70, n. 1, p. 3–21, 2012.

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.

REGNAULT, N. *et al.* Sex-specific associations of gestational glucose tolerance with childhood body composition. **Diabetes Care** v. 36, n. 10, p. 3045–3053, 2013.

REILLY, J. J.; KELLY, J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood:

Systematic review. **International Journal of Obesity** v. 35, n. 7, p. 891–898, 2011.

REYNOLDS, C. M. *et al.* Early life nutrition and energy balance disorders in offspring in later life. **Nutrients** v. 7, n. 9, p. 8090–8111, 2015.

RINALDI, W. *et al.* Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition** v. 11, n. 1, p. 1–9, 2014.

ROBERTS, C. K. *et al.* Effects of an intensive short-term diet and exercise intervention: comparison between normal-weight and obese children. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 305, n. 5, p. R552–R557, 2013.

ROCHA, G. L. *et al.* Effect of High Intensity Interval and Continuous Swimming Training on Body Mass Adiposity Level and Serum Parameters in High-Fat Diet Fed Rats. **The Scientific World Journal** v. 2016, p. 1–8, 2016.

RODRIGUES, A. L. *et al.* Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology** v. 195, n. 3, p. 485–494, 2007.

RODRIGUES, B. *et al.* Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology** v. 6, p. 1–7, 2007.

ROSEBOOM, T. J. *et al.* Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 185, n. 5, p. 93–98, 2001.

ROSS, M. G.; DESAI, M. Developmental programming of appetite/satiety.

Annals of Nutrition and Metabolism v. 64, n. SUPPL.1, p. 36–44, 2014.

ROSS, R.; ARU, J. *et al.* Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism** v. 282, n. 3, p. E657–E663, 2002.

ROSS, R.; FREEMAN, J. *et al.* Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 87, n. 11, p. 5044–5051, 2002.

ROWLAND, T. W. Effect of Obesity on Cardiac Function in Children and Adolescents: A Review. **Journal of sports science & medicine** v. 6, n. 3, p. 319–326, 2007.

SALANS, L. B.; CUSHMAN, S. W.; WEISMANN, R. E. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. **The Journal of clinical investigation** v. 52, n. December 1972, p. 929–941 , 1973.

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. 8, p. 2984–2998, 2015.

SANTOS-MONTEIRO, J. *et al.* Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil** v. 2, n. 1, p. 15–22, 2002.

SARR, O.; YANG, K.; REGNAULT, T. R. H. In utero programming of later adiposity: The role of fetal growth restriction. **Journal of Pregnancy** v. 2012 , 2012.

SARTURI, J.; NEVES, J.; PERES, K. Obesidade em adultos : estudo de base populacional num município de pequeno porte no sul do Brasil em 2005.

Ciência e Saúde Coletiva v. 15, n. 1, p. 105–113 , 2010.1413-8123.

SCHMIDT, I. *et al.* The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **International Journal of Obesity** v. 25, n. 8, p. 1168–1174, 2001.

SHEN, Y. *et al.* Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. **Obesity** v. 23, n. 5, p. 1000–1006, 2015.

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.

SINGH, A. S. *et al.* Tracking of childhood overweight into adulthood: A systematic review of the literature. **Obesity Reviews** v. 9, n. 5, p. 474–488, 2008.

SINGHAL, A; LANIGAN, J. Breastfeeding, early growth and later obesity. v. 8, p. 51–54, 2007.

SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **EMBO Reports** v. 12, n. 7, p. 620–622, 2011.

SKURK, T. *et al.* Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 92, n. 3, p. 1023–1033, 2007.

STANNER, S. A.; YUDKIN, J. S. Fetal programming and the Leningrad Siege Study. **Twin Research** v. 4, n. 5, p. 287–292, 2001.

STETTLER, N. *et al.* Weight gain in the first week of life and overweight in

adulthood: A cohort study of European American subjects fed infant formula.

Circulation v. 111, n. 15, p. 1897–1903, 2005.

SWIFT, D. L. *et al.* The role of exercise and physical activity in weight loss and maintenance. **Progress in Cardiovascular Diseases** v. 56, n. 4, p. 441–447, 2014.

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.

TCHERNOF, A.; DEPRES, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. **American Physiological Society** v. 93, n. 1, p. 359-404, 2013.

TREMMELE, M. *et al.* Economic Burden of Obesity : A Systematic Literature Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health** v. 14, n. 4 p. 1–18, 2017.

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

VAISERMAN, A. M. Early-life nutritional programming of longevity. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** v. 5, n. 5, p. 325–338, 2014.

VASUDEVAN, C.; RENFREW, M.; MCGUIRE, W. Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition** v. 96, n. 5, 2011.

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. **The Journal of Nutrition** v. 138, n. 9, p. 1622–1627, 2008.

VELKOSKA, E; MORRIS, M J. Mechanisms behind early life nutrition and adult

disease outcome. v. 2, n. 8, p. 127–132, 2011.

VICKERS, M. H. *et al.* Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition.

American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology v. 285, p. R271–R273, 2003.

VICKERS, M. H. *et al.* Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism** v. 279, n. 1, p. E83-87, 2000.

VIGITEL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

VON KRIES, R. *et al.* Breast feeding and obesity: Cross sectional study. **British Medical Journal** v. 318, n. 7203, p. 147–150, 1999.

WAHLQVIST, Mark L *et al.* Adolescence. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 1347, n. 1, p. 1–28, 2016a.

WAHLQVIST, M. L. *et al.* Early-life influences on obesity: from preconception to adolescence. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 1347, n. 1, p. 1–28, 2016b.

WANG, N. *et al.* High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sciences** v. 191, n. 77, p. 122–131, 2017.

WANG, Y.; BEYDOUN, M. A. The Obesity Epidemic in the United States — Gender, Age, Socioeconomic, Racial / Ethnic, and Geographic Characteristics : A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. **Epidemiologic Reviews**

v. 29, p. 6–28, 2007.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 69, n. 2, p. 179–197, 1999.

WELLS, J. C.K. The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: An ethological approach. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society** v. 81, n. 2, p. 183–205, 2006.

WENG, S. F. *et al.* Systematic review and meta-analyses of risk factors for childhood overweight identifiable during infancy. **Archives of Disease in Childhood** v. 97, n. 12, p. 1019–1026, 2012.

WESTON, K. S.; WISLØFF, U.; COOMBES, J. S. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine** v. 48, n. 16, p. 1227–1234, 2014.

WHO. Examination and processing of human semen. **WHO Press** v. 5th Editio, p. 286, 2010.

WHO. Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. **Bulletin of the World Health Organization** v. 87, p. 646–646, 2009.

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

WILLIAMS, R. L. *et al.* Effectiveness of weight loss interventions - is there a difference between men and women: A systematic review. **Obesity Reviews** v. 16, n. 2, p. 171–186, 2015..

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Adipokines and the signaling role of adipose

tissue in inflammation and obesity. **Future Lipidology** v. 1, n. 1, p. 81–89, 2006.

ZHANG, X.; HU, E. A.; WU, H.; MALIK, V. Qi Sun. HHS Public Access. **Obesity (Silver Spring)** v. 21, n. 4, p. 824–830, 2013.

YAMASAKI, K. *et al.* Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj: CD (SD) IGS rats. **Reproductive Toxicology** v. 15, n. 5, p. 533–536, 2001.

YIM, H. E. *et al.* Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. **Pediatric Research** v. 75, n. 2, p. 259–265, 2014.

YU, Z. B. *et al.* Birth weight and subsequent risk of obesity: A systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews** v. 12, n. 7, p. 525–542, 2011.

APÊNDICE A – Artigo 1 publicado no periódico “Diabetology & Metabolic Syndrome (Qualis B1/fator de impacto 2,413)

RESEARCH

Open Access



Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats

Carlos Gabriel de Lade^{1,2*}, Ana Eliza Andreazzi^{1,2}, Mariana Bolotari^{1,2}, Vinícius Moreira Gonçalves Costa^{1,2}, Vera Maria Peters^{1,2} and Martha de Oliveira Guerra^{1,2}

Abstract

Background: Obesity is associated with several comorbidities, such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, and may have its origin in early life stages, such as in the lactation period, through metabolic programming. Physical activity aids in decreasing the chances of developing cardiovascular and metabolic diseases, even with small weight losses and, in children, can play an essential role in preventing weight gain and other health problems. The present study aimed to evaluate the effects of moderate intensity endurance training and high intensity interval training (HIIT) protocols on obesity-related parameters and cardiorespiratory capacity in overfed Wistar rats throughout the breastfeeding period.

Methods: Two days after birth, forty male and female Wistar rats were clustered into two groups: Control Litter Group (CL; ten animals/litter) and Reduced Litter Group (RL; four animals/litter). At weaning, RL animals were distributed randomly into three experimental groups: sedentary, moderate intensity endurance training and HIIT, while CL animals were clustered into a sedentary group.

Results: RL male and female body weight, before weaning, was significantly higher when compared with CL animals. This difference was maintained between CLSed and RLSed groups after weaning during all assessed periods. Adiposity was significantly higher in RLSed males when compared to CLSed males, and alterations in glycaemic metabolism were also observed. Endurance and HIIT protocols were efficient in improving maximal cardiorespiratory capacity, as well as concerning the glycaemic metabolism and central fat accumulation of males and females submitted to childhood overfeeding by the litter reduction method.

Conclusions: Both moderate endurance training and HIIT protocols included in early life were efficient in reverting or preventing certain metabolic alterations as a consequence of overfeeding during breastfeeding in male and female Wistar rats.

Keywords: Childhood obesity, Obesity management, Insulin resistance, Glucose intolerance, Aerobic exercise, High-intensity interval training, Rats

*Correspondence: lade.gab@gmail.com

¹ Reproductive Biology Center, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n. Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Post-natal development is considered an important event with respect to plasticity and maturation of physiological systems, which makes it more sensible to environmental influence. Furthermore, it may directly contribute to the development of long-term diseases, such as type 2 diabetes mellitus (DM2) and overweight, among others [1], a phenomenon known as metabolic programming [2].

In rodents, overfeeding throughout the breastfeeding period can be induced by litter reduction, leading to rises in caloric intake due to less competition for breastfeeding. Besides presenting an early hyperglycaemia profile, fat accumulation and overweight [3], rats and mice from reduced litters may present overweight, obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperleptinemia, hyperphagia, glucose intolerance, dyslipidaemia and blood pressure rises in adult life [4].

In humans, evidence demonstrates that 150–250 min of moderate physical activity per week, with a calorie burn of around 1.200–2.000 kcal, would be enough to prevent weight gain. In addition, physical activity aids in decreasing the chance of cardiovascular and metabolic disease development, improves physical fitness and health indicators in obese individuals, even with small weight losses [5, 6] and, in children, can play an essential role in preventing weight gain and other health problems [7].

Sustained sessions of moderate aerobic exercises or endurance, performed along several weeks, increase the oxidative capacity of skeletal muscles, modifying the energy source used during effort episodes, resulting in increased aerobic capacity. However, recent studies demonstrate that High Intensity Interval Training (HIIT) alters the energetic metabolism of skeletal muscles, and is similar to certain adaptations caused by a moderate aerobic training [8, 9].

An increased body of evidence in healthy individuals has demonstrated that HIIT brings cardiovascular and metabolic benefits, similar to or greater than those reached by moderate endurance training [10–13]. However, reports found in literature still indicate some controversy with respect to the comparison between HIIT protocol efficacy and moderate endurance protocols related to strategies focused on the management of overweight/obesity and related problems. In addition, the relation between the regular practice of different types of physical training, including during childhood, in individuals overfed during the breastfeeding period requires further study. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of moderate intensity endurance training and high intensity interval training protocols on obesity-related parameters and cardiorespiratory capacity on overfed Wistar rats throughout breastfeeding period.

Methods

Animals

Twenty-four pregnant Wistar rats were used throughout this study, obtained from the Reproductive Biology Center's (CBR) breeding facilities at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), whose offspring, forty males and forty females, were used in the experiment. Two days after birth, the animals were clustered into two groups: Control Litter Group (CL; ten animals/litter) and Reduced Litter Group (RL; four animals/litter) in order to compose, the experimental groups after weaning. Litter reduction was accomplished 2 days after birth, according to Bei et al. [4], and animal management aiming to arrange litters composed only by males or females followed the same author.

The animals were maintained in ventilated ALESCO® cabinets with controlled air flow under standard laboratory conditions, with controlled humidity, ventilation, temperature of 22 ± 2 °C and a 12:12-h light–dark cycle. After weaning (21 days after birth) the animals were fed standard feed NUVILAB CR1® pellets (Nuvital Nutrientes Ltda. Colombo, Brazil) and water ad libitum. All procedures were approved by the UFJF Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UFJF), Protocol No. 045/2016.

Experimental groups

At weaning, RL animals were distributed randomly into three experimental groups: sedentary (RLSed), endurance (RLEnd) and HIIT (RLHIIT), while CL animals comprised a sedentary group (CLSed). Additional file 1: Figure S1 illustrates the flow chart used as guide for the configuration of the experimental groups.

Cardiorespiratory fitness tests (VO_2 max) and training protocols

Immediately after weaning, animals were submitted to an adaptation period on a motorized treadmill with 6 stands (Insight®) for 5 days of running, during 10 min and progressive speed, where they were trained afterwards.

Before, during and after the training protocols, all animals, including those belonging to the sedentary groups, were evaluated concerning maximum aerobic capacity (VO_2 max), on a metabolic treadmill (Panlab®) by using a gas analyser (Harvard Apparatus®). The protocol involved running on a treadmill until exhaustion, at a 5° inclination, starting at a 6 m/min speed, increasing speed at 3 m/min every 3 min until animals were unable to continue [14].

Apart from the assessment criteria for cardiorespiratory fitness and training efficiency, the results from the tests performed after 4 and 8 weeks of training were used

for a better adjustment of the training load, making it more individual and according to the aerobic capacity of each animal.

After forming the experimental groups, two physical training protocols were used, namely endurance and HIIT. The endurance protocol was characterized by a moderate intensity (65–70% VO_2 max), 60 min per session, for 8 weeks. Each training session consisted of 10 min as a warm-up (50% VO_2 max) and 50 min for the main routine (65–70% of VO_2 max). The adjustment of the training load was delivered during the 4th week of training, after a new VO_2 max assessment. HIIT sessions encompassed about 40 min, split into 10 min as a warm-up (50% VO_2 max) and six 3-minute periods running at high intensity (85–90% VO_2 max) alternated with 2-min periods running at low intensity (50% VO_2 max), summing 30 min for the main routine. All training protocols began after an adaptation period and the first VO_2 max test, which was carried out at about the 30th post-natal day, and were performed 3 times per week on alternate days.

Oral glucose tolerance test (OGTT) and Insulin tolerance test (ITT)

For both tests, animals were submitted to a 6-h fasting period. Blood was collected through a lancet in the animal's tail so as to gauge capillary glycaemia by using an AccuChek Advanced (Roche®, Germany) glucometer. The tests were carried out a week before euthanasia, at 72-h intervals.

During the OGTT test, basal glycaemia (T_0) was measured and, subsequently, 2 g/kg of body weight of a 50% glucose solution was administered via force feeding. Soon after, blood samples were collected at times T_1 (15'), T_2 (30'), T_3 (60') and T_4 (120'). The total area under the OGTT curve was calculated.

During ITT, the animals received an intraperitoneal infusion of insulin (1 U/kg of body weight) and blood samples were collected before (T_0) administering the insulin and at times T_1 (5'), T_2 (15'), T_3 (30') and T_4 (45') after the insulin administration. The constant rate for glucose disappearance (K_{it}) was computed through the formula $0.693/(t_{1/2})$, where $t_{1/2}$ is calculated from the slope of the smallest quadratic analysis of plasma glucose concentrations after insulin administration [15].

Body weight, visceral adipose and food intake

CL and RL body weight were monitored weekly from the fourth post-natal day on, until the 90th day of life. The Lee index (LI), which assesses overweight/obesity, was computed through the formula $[LI = (BM \times 1/3)/NAL \times 100]$, where BM = body weight (g); NAL = nasoanal length (NAL) (cm). Food intake was also registered

weekly by computing the difference between the amount of offered and remaining food, 24 h after delivery.

Animals were euthanized via diaphragmatic rupture after all "in vivo" procedures were carried out. The anaesthetic protocol combined 90 mg/kg (Vetanarcol, Konig, Brasil) of the dissociative anaesthetic Ketamine hydrochloride and 10 mg/kg (Kensol, Konig, Brasil) of the muscle relaxant of xylazine hydrochloride. Both drugs were blended and administered together via the intraperitoneal route. After blood extraction through cardiac puncture under general anaesthesia, the collected blood was centrifuged, and the serum was stored at -80°C . Immediately after euthanasia, retroperitoneal and perigonadal adipose tissues were removed and weighed on a fine scale (Bioprecisa®-specificity 0.0001 g—Brasil).

Biochemical serum analysis

The biochemical analysis was carried out on an automated Cobas c111 (Roche®) device using Cobas c111 kits for total cholesterol HDL, LDL, triglycerides and blood glucose.

Statistical analyses

First, the Shapiro–Wilk test was applied in order to verify data normality. Aiming to detect possible alterations in RL animals, comparisons between CLSed groups and their respective RLSed groups were carried out by applying a t-Student or Mann–Whitney test. Regarding possible alterations between sex and types of training, a two-way ANOVA was applied, while a one-way ANOVA, followed by a Tuckey post hoc test was applied when comparing, separately, RL males and females from the same group. In order to obtain the OGTT results, the total area under the glycaemia curve was computed. Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation) at a significance level of $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using the SPSS (SPSS Inc®, versão 21) and GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, USA) softwares.

Results

RL males and females body weight, before weaning, was significantly greater from the fourth and 10th day of life on, respectively, when compared with CL animals. This difference remained steady between CLSed and RLSed groups after weaning during all assessed periods (Additional file 2: Figures S2A and S2B). No significant differences between RLSed, RLEnd and RLHIIT male body weight after weaning until the 90th day of life were detected (Additional file 2: Figure S2C). However, for females, this difference was registered only in the last measurement point, where CLSed presented a statistically higher body weight mean compared to RLEnd and RLHIIT (Additional file 2: Figure S2D).

RLSed males presented significantly higher food intake for eight out of nine measurements assessed with respect to CLSed (Additional file 2: Figure S2E). Regarding CLSed and RLSed females, differences in food intake were only detected for five out of nine measurement points, where RLSed reached higher values, (Additional file 2: Figure S2F). As for the food intake of RLSed, RLEnd and RLHIIT animals, significant differences were registered among males during the 2nd week assessment, where RLSed presented a higher mean consumption compared to RLEnd and RLHIIT (Additional file 2: Figure S2E). In females, significant differences were observed during the 7th week, where RLSed and RLEnd presented higher mean consumption compared to RLHIIT (Additional file 2: Figure S2F).

Additional file 3: Figures S3A and S3B display the comparisons between maximum oxygen consumption at days 30 (VO₂-1), 60 (VO₂-2), 90 (VO₂-3) for the CLSed and RLSed groups of both males and females.

No statistically significant differences in any of the three assessed time periods were observed for males and females from the CLSed and RLSed groups. Nevertheless, when comparing the VO₂ max test results between the first (VO₂-1) and the third (VO₂-3) test, a depletion oxygen consumption for the CLSed and RLSed groups, both males and females was observed. In males, the difference between VO₂-1 and VO₂-3 reached 19% (CLSed) and 30% (RLSed), while in females, the difference reached 19% (CLSed and RLSed).

With respect to the comparison among RL animals, groups trained in endurance and HIIT showed statistically significant differences between the third test results (VO₂-3) and the first test results (VO₂-1), both for males and females, pointing out the efficiency of both training protocols concerning increased breathing capacity in trained animals. In males, the differences reached 29% in the RLEnd group and 21% in the RLHIIT group. The same behaviour was observed for trained females, with 24% and 18% increases in the RLEnd and RLHIIT groups, respectively. However, concerning the sedentary groups, 30% and 19% drops in the VO₂ max in the RLSed groups of both males and females, respectively, were observed.

No statistically significant differences between the means overfed groups of males and females trained in endurance and HIIT protocols were observed for the last VO₂ max results. Nevertheless, the RLEnd group of males presented VO₂ max 61% higher than the values reached by the RLSed group, while the difference between the RLHIIT and RLSed groups reached 59%. The same behaviour was observed for females, where the RLEnd and RLHIIT groups reached 47% and 39% higher values than those presented by the RLSed group respectively.

OGTT results for males and females of the CLSed, RLSed, RLEnd and RLHIIT groups are displayed in Additional file 4: Figures S4A and S4C. The area under the curve in RLSed males was 11.2% higher when compared to CLSed animals statistically significant. This difference was also observed for OGTT female results, in which the RLSed group exhibited a 9% higher area under the curve 9 in comparison with the CLSed group. OGTT results for RL animals showed no statistically significant differences, neither for males or female of endurance and HIIT trained groups when compared to the RLSed groups (Additional file 4: Figures S4B and S4D).

Concerning the Insulin Tolerance Test (ITT), RLSed males showed a constant rate of glucose disappearance means (K_{itt}), 39% lower when compared to the CLSed group in the ITT, statistically significant, demonstrating major resistance to insulin in the overfed group (Additional file 4: Figure S4E). No difference concerning the K_{itt} means between the CLSed and RLSed groups for females was observed (Additional file 4: Figure S4F).

Among RL males (Additional file 4: Figure S4E), the RLSed group reached lower values of constant rate of glucose disappearance (K_{itt}) throughout the ITT when compared to both the RLEnd group (51%) and the RLHIIT group (60%), demonstrating major resistance to insulin in sedentary overfed animals when compared to endurance and HIIT trained groups. However, among females, the RLHIIT group reached a higher mean K_{itt} than animals from the RLSed (23%) and RLEnd (30%) groups. In other words, HIIT training was more efficient in increasing sensitivity to insulin in females compared to endurance training (Additional file 4: Figure S4F).

Table 1 displays body weight 90 days after birth, nasoanal length, the Lee index and adiposity (relative weights of perigonadal and retroperitoneal adipose tissues) of males and females belonging to the CLSed, RLSed, RLEnd and RLHIIT groups. Both RLSed males and females reached significantly greater body weight values when compared to their respective CLSed groups. On the other hand, no differences were observed for the NAL and the Lee index. Adiposity, represented by the relative weights of perigonadal and retroperitoneal adipose tissues, was significantly higher in RLSed males when compared to CLSed males, at 26% and 58%, respectively.

A significant difference regarding relative retroperitoneal adipose tissue weight was observed for females, where the RLSed group reached a means 45% higher in comparison to the CLSed group. Despite not presenting a significant difference, the RLSed group means was 31% higher compared to the CLSed group means.

No statistically significant differences for final body weight, NAL, or the Lee Index were observed between RL male groups, although differences were noted for

Table 1 Body mass, Lee Index, NAL and adiposity of the male and female groups at the 90th day

	Males			
	CLSed	RLSed	REnd	RLHIIT
BM (g)	272.70 ± 22.27	303.25 ± 26.75 ^a	297.6 ± 24.42	295.15 ± 38.37
NAL (cm)	23.60 ± 0.52	24.12 ± 0.74	24.05 ± 0.63	24.00 ± 0.96
Lee Index	27.51 ± 0.55	27.84 ± 0.63	27.68 ± 0.28	27.76 ± 0.59
Adiposity (%)				
Perigonadal	1.55 ± 0.30	1.87 ± 0.31 ^a	1.56 ± 0.18*	1.57 ± 0.35 [‡]
Retroperitoneal	1.50 ± 0.48	2.25 ± 0.50 ^b	1.45 ± 0.30*	1.62 ± 0.47 [‡]
	Females			
	CLSed	RLSed	REnd	RLHIIT
BM (g)	176.45 ± 10.59	196.5 ± 17.72 ^b	174.95 ± 15.84*	173.85 ± 16.73 [‡]
NAL (cm)	20.5 ± 0.6	21.34 ± 0.74	21.12 ± 0.23	20.98 ± 0.46
Lee Index	26.11 ± 0.36	26.76 ± 0.81	26.11 ± 0.20	26.01 ± 0.21
Adiposity (%)				
Perigonadal	1.43 ± 0.37	2.08 ± 0.58 ^b	1.82 ± 0.41	1.38 ± 0.43 [‡]
Retroperitoneal	1.38 ± 0.63	1.81 ± 0.44	1.35 ± 0.35*	1.51 ± 0.41

Results are presented as means and standard deviations. A total of 10 rats were used from both groups for all parameters

BM body mass, NAL nasoanal length

*Significant difference compared to RLSed ($p < 0.05$)

^{a,b} Significant difference compared to CLSed ($p < 0.05$)

adiposity. The RLSed group presented higher means for relative perigonadal adipose tissue weight in relation to REnd (20%) and RLHIIT (19%) and also for the relative retroperitoneal adipose tissue weight in relation to the two trained groups, with 38% (REnd) and 32% (RLHIIT) differences, respectively. RLSed females reached a statistically higher final body weight means than REnd (12%) and RLHIIT (13%) females. In addition to body weight differences, RLSed presented a statistically higher relative perigonadal tissue weight compared to the RLHIIT group (51%) and a statistically higher relative retroperitoneal tissue weight compared to the REnd group (34%). No NAL and Lee Index differences between groups of RL females were observed.

A significant difference as observed for male CLSed and RLSed biochemical serology, namely serum glucose, where RLSed registered a 14% higher means. Despite no statistical differences, the means of total cholesterol and triglycerides in the RLSed groups were 36% and 10% higher when compared to the CLSed means, respectively. A significant difference for female HDL was also observed, higher in the CLSed group compared to the RLSed group (Table 2).

Serum glucose means in RLSed males groups were 14% and 18% higher than in males from the REnd and RLHIIT groups, respectively. Among females, the RLSed group registered a statistically higher glucose serum means compared to the REnd group (11%). Despite no

statistical difference, the RLSed group registered an 8% higher means than the RLHIIT group. In addition, LDL means in the RLSed group was significantly higher than the RLHIIT group (39%) and 21% higher than the REnd mean, albeit non-significantly.

Furthermore, no interactions between sex and type of training were observed for any of the assessed variables.

Discussion

Metabolic syndrome prevalence has increased, mainly worsened by infant obesity rises, which, in turn, lead to increased health problems risks in overweight children [16]. As obesity tends to be maintained during adulthood, it is reasonable to think of this condition as maintained during adulthood in overweight children [17, 18]. The overweight/early obesity induction protocol via litter reduction is currently widely applied, as it allows for the imitation of overfeeding in humans, common when using nutritive formulas, for instance, which may imply in metabolic alterations in adult life [4].

Evidence classifies physical exercises and regular physical activity as a non-medicine treatment option for the control and prevention of children and adult obesity, with a noticeable improvement in the metabolic condition, even with body weight alterations [19]. Nevertheless, children are not usually involved in appropriate physical activity programs, as only one out of three children can be considered physically active. Increasing regular

Table 2 Biochemical variables of the male and female groups at the 90th day

	Males			
	CLSed	RLSed	RLEnd	RLHIIT
Blood glucose (mg/dL)	168.97 ± 26.76	192.83 ± 12.32 ^a	169.57 ± 26.22 ^a	163.82 ± 17.59 ^a
Total cholesterol (mg/dL)	63.8 ± 10.63	70.09 ± 11.69	67.95 ± 8.95	70.84 ± 8.56
HDL (mg/dL)	56.53 ± 8.93	61.50 ± 9.53	61.48 ± 7.96	63.00 ± 7.05
LDL (mg/dL)	9.86 ± 1.66	9.83 ± 1.42	10.41 ± 2.88	9.55 ± 2.57
Triglycerides (mg/dL)	30.91 ± 10.09	42.07 ± 13.83	33.66 ± 15.80	36.81 ± 11.55
	Females			
	CLSed	RLSed	RLEnd	RLHIIT
Blood glucose (mg/dL)	168.59 ± 15.33	166.06 ± 13.15	149.22 ± 21.55 ^a	153.92 ± 7.09
Total cholesterol (mg/dL)	70.82 ± 4.80	71.54 ± 6.18	67.28 ± 11.78	62.22 ± 7.67
HDL (mg/dL)	64.77 ± 6.41	56.88 ± 5.86 ^b	60.73 ± 10.83	61.95 ± 4.22
LDL (mg/dL)	7.70 ± 1.50	8.79 ± 2.68	7.24 ± 1.58	6.30 ± 1.51 ^a
Triglycerides (mg/dL)	26.18 ± 4.82	30.40 ± 5.51	27.67 ± 5.62	25.47 ± 2.27

Results are presented as means and standard deviations. A total of 10 rats were used from both groups for all parameters

^a Significant difference compared to NRSed ($p < 0.05$)

^{a,b} Significant difference compared to CLSed ($p < 0.05$)

physical activity practice is considered as a crucial intervention on children's health [7, 19].

In the present study, RLSed animals presented higher body weight than their respective CLSed since the 1st days of life until the 90th day after birth, also consuming higher food amounts. However, displaying more relevance compared to the observed differences in body weight, both male and female RLSed animals registered a relative weight gain in perigonadal and retroperitoneal adipose tissues. Some years ago, the litter reduction model was applied in order to demonstrate that not only was somatic rat growth affected, but a disproportional increase of body fat deposition was also detected [20]. The results of the present study corroborate those reported by Habbout et al. [21] since, according to the authors, overfeeding during breastfeeding has been related to a higher probability of hyperphagia, overweight and obesity and, in rodents, tends to maintain after weaning, even when offspring is fed standard feed.

RLSed males presented alterations in their glycemic metabolism compared to CLSed males, displaying higher serum glycaemia, reduced glucose tolerance (OGTT) and a superior resistance to insulin, expressed as a lower K_{ITT} value. Regarding females, the RLSed group presented reduced glucose tolerance (OGTT) only. Several studies have focused on the effects of early overfeeding and alterations in the insulin-glucose axis in adult animals, since these animals frequently exhibit augmented glycaemia and insulin values, as well as unbalances in the insulin-glucose axis [22, 23]. Overfeeding during breastfeeding may lead to modifications of insulin signalization routes

in skeletal muscles, increasing visceral fat accumulation and insulin resistance [24], in agreement to the results reported herein.

According to the reported results, the glycemic metabolism of RLSed males was more damaged by overfeeding during breastfeeding when compared to RLSed females. This difference between males and females corroborate a claim made by Basset and Graig [25], who demonstrated higher sensitivity to insulin in female adipocytes, due to an increase in receptor connectivity and, consequently, higher cellular glucose uptake.

The present study aimed to evaluate different physical exercises programs integrated in the early life of animals overfed during breastfeeding. When compared to the RLSed group, both RLEnd and RLHIIT males and females registered gains in VO_2 max at the end of 8 weeks training, with significant differences when compared to the RLSed groups, but with no differences between them, demonstrating the efficiency of both training protocols to reach VO_2 max. Fisher et al. [26] distributed 28 overweight men into HIIT training and moderate endurance groups, for 6 weeks, concluding that both were effective and with no differences concerning cardiorespiratory fitness gain. Kong et al. [27] also verified that both training types were efficient at increasing VO_2 max in young and obese women. This data is relevant clinically, since VO_2 max gain is associated to minor risks for cardiometabolic disease appearance and death for all reasons [7, 28].

In comparison to their respective RLSed, the trained groups presented lower relative adipose tissue weight, with no differences between both training types

concerning central fat gain. Clinically, this data becomes crucial, since lower fat volume located in the abdominal cavity is directly related to minor risks for cardio-metabolic disease development [29]. Türk et al. [30], concluded that HIIT was more effective at decreasing body fat in comparison with endurance training in obese adults. On the other hand, Kong et al. [27] verified that obese endurance trained women presented significant improvement in body composition, that did not occur in the HIIT trained group. Ficher et al. [26] concluded that both HIIT and endurance were effective and presented no significant differences regarding body fat ratio reduction in overweight men.

Both training protocols were effective at improving the glycemic metabolism of trained RL animals, with a drop in glycaemia levels during fasting in endurance and HIIT trained males and females, despite non-significant differences with RLHIIT females. Clinically, increases in impaired fasting glucose in infants have been associated with increased DM2 risk in adulthood [31] and the results reported herein show equivalence of both types of exercises beginning in the childhood period on hyperglycaemia prevention in adult RL animals. On the other hand, no OGTT differences for both males and females belonging to the RLEnd and RLHIIT groups when compared to the CLSed group were detected, concluding that both adopted protocols were inefficient at improving insulin tolerance in trained RL animals. In spite of this, RLEnd and RLHIIT males presented higher sensitivity to insulin in the ITT, as well as RLHIIT females, when compared to their respective RLsed groups.

The glycemic metabolism of RL males is more impacted by overfeeding during breastfeeding compared to RL females [25], which may explain the absence of differences concerning insulin sensitivity between CLSed and RLsed females. Some studies indicate some similarity between HIIT and endurance effects on insulin sensitivity [26], while others report that higher intensity HIIT training may be more decisive in improving this parameter, even among healthy individuals [32], which can explain the higher sensitivity to insulin observed in RLHIIT females.

Moderate endurance exercise is usually prescribed aiming to improve body composition, physical capacity and certain health parameters in children and adults. However, interest in HIIT protocols has increased recently, mainly due to the same benefits brought by moderate endurance training, but less lengthy. Despite increased studies comparing both types of exercises, only some compare their effects on overweight children. Araujo et al. [33] compared moderate endurance and HIIT protocol effects in overweight children, concluding that both types of training were efficient at improving peak VO_2

and general health condition. Two meta-analyses [32, 34] compared HIIT protocols and moderate endurance. The authors observed that HIIT can be considered more effective in improving several health parameters, such as VO_2 max and insulin resistance, with a lower training volume. However, the same authors point out certain constraints, such as the amount of included studies and intervention duration, which requires further research to reach more robust conclusions.

The present study is relevant since, in contrast to experimental studies involving metabolic alterations and physical exercise, animals were submitted to training protocols at an early stage, specifically, soon after weaning. Results indicate that the adopted moderate endurance and HIIT protocols were efficient at improving some conditions caused by overfeeding during breastfeeding, mainly glycemic metabolism parameters and prevention of central fat gain. Regular physical exercise is beneficial in early life, even for inadequately fed individuals during a crucial development stage and, consequently, at higher risk for metabolic alterations. These results could aid in physical exercises program composition, as part of non-medical treatment aiming at losing weight and obtaining metabolic improvement in early overweight children, as well as reducing risks for cardiometabolic diseases in adult life. Further studies involving litter reduction model and different physical exercise protocols, such as type, duration, intensity and weekly frequency, are required in order to better understand the influence of physical activity in individuals with early body weight alterations and possible long term metabolic alterations.

Conclusions

Both moderate intensity endurance training and HIIT protocols included in early life were efficient concerning cardiorespiratory capacity gain, lower relative adipose tissue weight, and improvement in glycemic metabolism, reverting or preventing metabolic alterations as consequence of overfeeding during breastfeeding, in both male and female Wistar rats.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Study flow chart. RL: reduced litter group; CL: control litter group; HIIT: high intensity interval training.

Additional file 2: Figure S2. Male and female body mass and food intake. Male (A) and female (B) body mass before weaning. CLSed, RLsed, RLEnd and RLHIIT male (C) and female (D) body mass after weaning. CLSed, RLsed, RLEnd and RLHIIT male (E) and female (F) food intake after weaning. Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used for both groups for all parameters. *CL and RL intergroup differences; #RL intragroup differences. $p < 0.05$.

Additional file 3: Figure S3. Male (A) and female (B) maximal oxygen uptake (VO_2 max). Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used in both groups for all parameters. ^{a,b,c,d}intragroup differences at VO_2 max-1 and VO_2 max-3; ^{ab}differences between NREnd/NRHIT groups compared to NRsed at VO_2 max-3. $p < 0.05$.

Additional file 4: Figure S4. Oral glucose tolerance test (OGTT) and Insulin tolerance test (ITT) in males and females. Male OGTT (A) and (B) respective area under the curve; Female (C) OGTT and (D) respective area under the curve; (E) Male ITT and respective K_{ITT} ; (F) Female ITT females and respective K_{ITT} . ^{ab}Same letters or symbols: significant differences. $p < 0.05$.

Abbreviations

CL: control litter; BM: body mass; DM: diabetes *mellitus*; DM 2: type 2 diabetes *mellitus*; END: endurance training; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; HIIT: high intensity interval training; ITT: insulin tolerance test; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; NAL: nasoanal length; OGTT: oral glucose tolerance test; RL: reduced litter; VO_2 max: maximal oxygen uptake.

Authors' contributions

CGL, AEA, VMP, and MOG conceived the study, participated in its design and coordination and in the manuscript preparation. CGL, MB, and VMGC collected the data. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Reproductive Biology Center, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n. Campus Universitário, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil. ² Department of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

Acknowledgements

Reproductive Biology Center (UFJF). Rede Mineira de Bioterismo. Rede Mineira Toxicfar.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its Additional files.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by UFJF Ethics Committee on Animal Use (Protocol 045/2015).

Funding

Rede Mineira de Bioterismo—FAPEMIG (Project Number RED 00009/14). Rede Mineira Toxicfar—FAPEMIG (Project Number RED 00008/14).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 2 August 2018 Accepted: 21 September 2018

Published online: 26 September 2018

References

- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):179–97.
- Katzmarzyk PT, Barlow S, Bouchard C, Catalano PM, Hsia DS, Inge TH, et al. An evolving scientific basis for the prevention and treatment of pediatric obesity. *Int J Obes*. 2014;38(7):887–905.

- Portella AK, Silveira PP, Laureano DP, Cardoso S, Bittencourt V, Noschang C, et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behav Brain Res*. 2015;278:66–73.
- Bei F, Jia J, Jia Y-Q, Sun J-H, Liang F, Yu Z-Y, et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis*. 2015;14(1):96.
- Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(2):459–71.
- Swift DL, Johannsen NM, Lavie CJ, Earnest CP, Church TS. The role of exercise and physical activity in weight loss and maintenance. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(4):441–7.
- Spear BA, Barlow SE, Ervin C, Ludwig DS, Saelens BE, Schetzina KE, et al. Recommendations for treatment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics*. 2007;120(Suppl):S254–88.
- Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol*. 2006;575(3):901–11.
- Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2008;36(2):58–63.
- Burgomaster KA, Hughes SC, Heigenhauser GJF, Bradwell SN, Gibala MJ, Kirsten A, et al. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol*. 2005;98(6):1985–90.
- Ciulac EG, Bocchi EA, Bortolotto LA, Carvalho VO, Greve JMD, Guimarães GV. Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension. *Hypertens Res*. 2010;33(8):836–43.
- Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*. 2010;588(6):1011–22.
- Nybo L, Sundstrup E, Jakobsen MD, Mohr M, Hornstrup T, Simonsen L, et al. High-intensity training versus traditional exercise interventions for promoting health. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(10):1951–8.
- Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:1–7.
- Andreazzi AE, Scomparin DX, Mesquita FP, Balbo SL, Gravena C, De Oliveira JC, et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J Endocrinol*. 2009;201(3):351–9.
- Lau PWC, Wong DP, Ngo JK, Liang Y, Kim CG, Kim HS. Effects of high-intensity intermittent running exercise in overweight children. *Eur J Sport Sci*. 2015;15(2):182–90.
- Maffei C, Tato L. Long-term effects of childhood obesity on morbidity and mortality. *Horm Res*. 2001;55(suppl 1):42–5.
- Reis JP, Loria CM, Lewis CE, Powell-Wiley TM, Wei GS, Carr JJ, et al. Association between duration of overall and abdominal obesity beginning in young adulthood and coronary artery calcification in middle age. *JAMA*. 2013;310(3):280–8.
- Foster C, Moore JB, Singletary CR, Skelton JA. Physical activity and family-based obesity treatment: a review of expert recommendations on physical activity in youth. *Clin Obes*. 2017;8(1):68–79.
- Knittle JL, Hirsch J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. *J Clin Invest*. 1968;47(9):2091–8.
- Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr*. 2013;143(5):553–62.
- Habbout A, Delemaure S, Goirand F, Guillard JC, Chabod F, Sediki M, et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie*. 2012;94(1):117–24.
- Cunha ACDSR, Pereira RO, dos Santos Pereira MJ, de Melo Soares V, Martins MR, Teixeira MT, et al. Long-term effects of overfeeding during

- lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*. 2009;20(6):435–42.
24. Liu HW, Mahmood S, Srinivasan M, Smiraglia DJ, Patel MS. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnutrition in the immediate postnatal life in rats. *J Nutr Biochem*. 2013;24(11):1859–69.
 25. Bassett DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol*. 1988;64(8):750–758.
 26. Fisher G, Brown AW, Bohan Brown MM, Alcorn A, Noles C, Winwood L, et al. High intensity interval- vs moderate intensity-training for improving cardiometabolic health in overweight or obese males: a randomized controlled trial. *PLoS ONE*. 2015;10(10):1–15.
 27. Kong Z, Fan X, Sun S, Song L, Shi Q, Nie J. Comparison of high-intensity interval training and moderate-to-vigorous continuous training for cardiometabolic health and exercise enjoyment in obese young women: a randomized controlled trial. *PLoS ONE*. 2016;11(7):1–16.
 28. O'Malley G, Ring-Dimitriou S, Nowicka P, Vania A, Frelut M-L, Farpour-Lambert N, et al. Physical activity and physical fitness in pediatric obesity: what are the first steps for clinicians? Expert conclusion from the 2016 ECOG workshop. *Int J Exerc Sci*. 2017;10(4):487–96.
 29. Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Consolim-Colombo FM, Egan BM. Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8(1):1–8.
 30. Türk Y, Theel W, Kasteleyn MJ, Franssen FME, Hiemstra PS, Rudolphus A, et al. High intensity training in obesity: a meta-analysis. *Obes Sci Pract*. 2017;3(3):258–71.
 31. Hagman E, Danielsson P, Brandt L, Ekblom A, Marcus C. Association between impaired fasting glycaemia in pediatric obesity and type 2 diabetes in young adulthood. *Nutr Diabetes*. 2016;6(8):e227.
 32. Jelleyman C, Yates T, O'Donovan G, Gray LJ, King JA, Khunti K, et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. *Obes Rev*. 2015;16(11):942–61.
 33. Araujo AC, Roschel H, Picanço AR, do Prado DML, Villares SMF, de Sá Pinto AL, et al. Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. *PLoS ONE*. 2012;7(8):1–8.
 34. Garcia-Hermoso A, Cerrillo-Urbina AJ, Herrera-Valenzuela T, Cristi-Montero C, Saavedra JM, Martínez-Vizcaino V. Is high-intensity interval training more effective on improving cardiometabolic risk and aerobic capacity than other forms of exercise in overweight and obese youth? A meta-analysis. *Obes Rev*. 2016;17(6):531–40.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

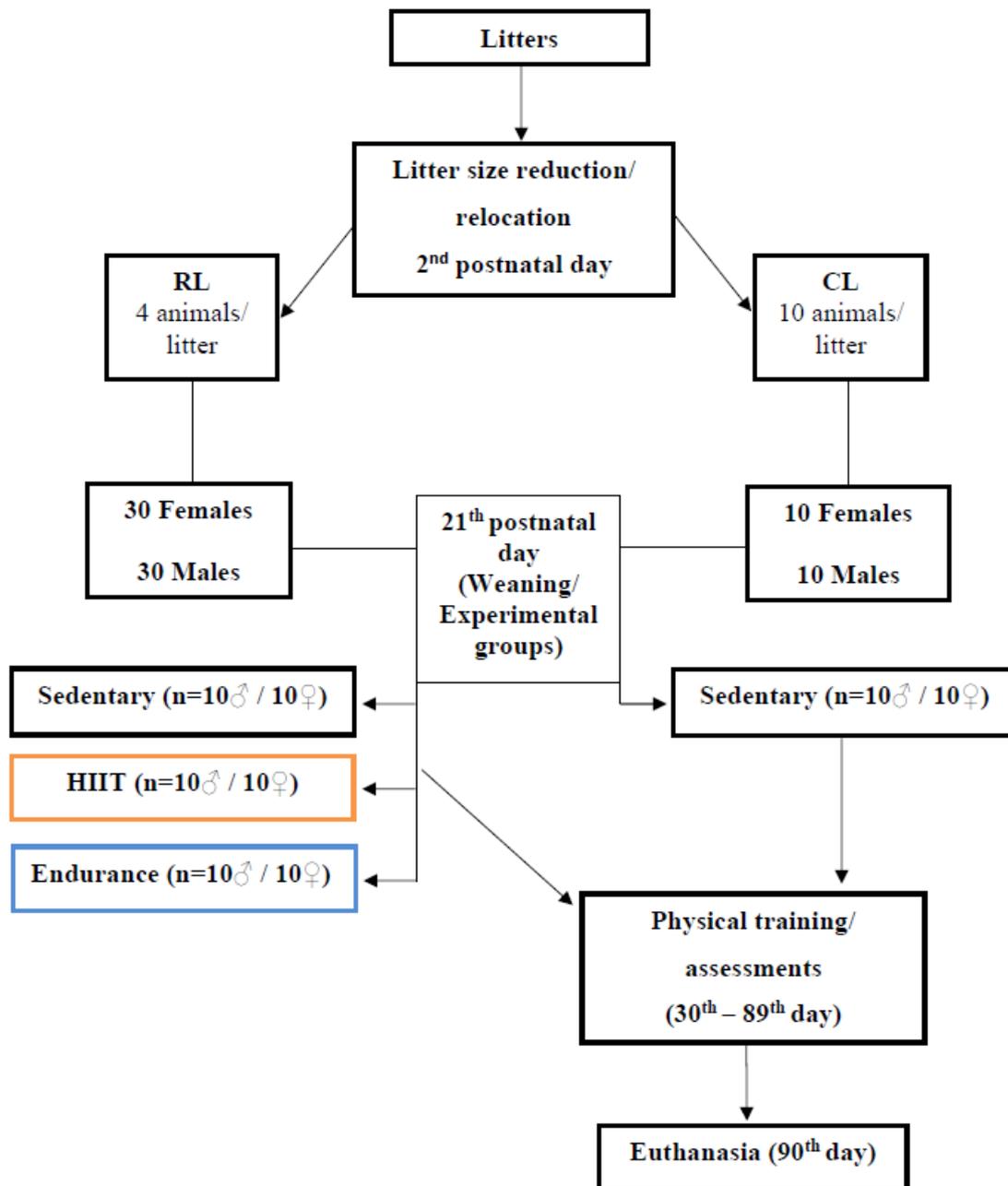
At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

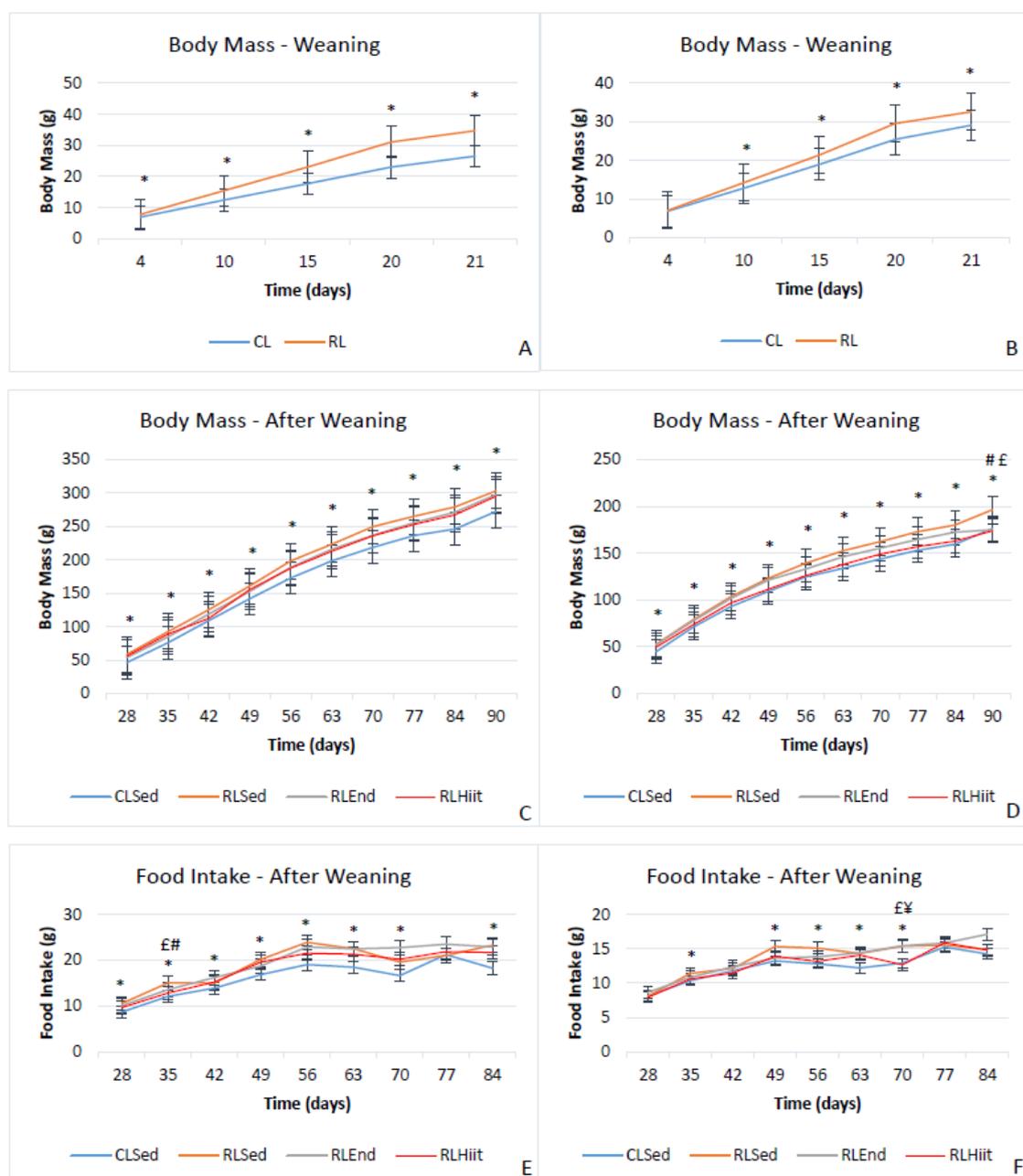


ADDITIONAL FILE

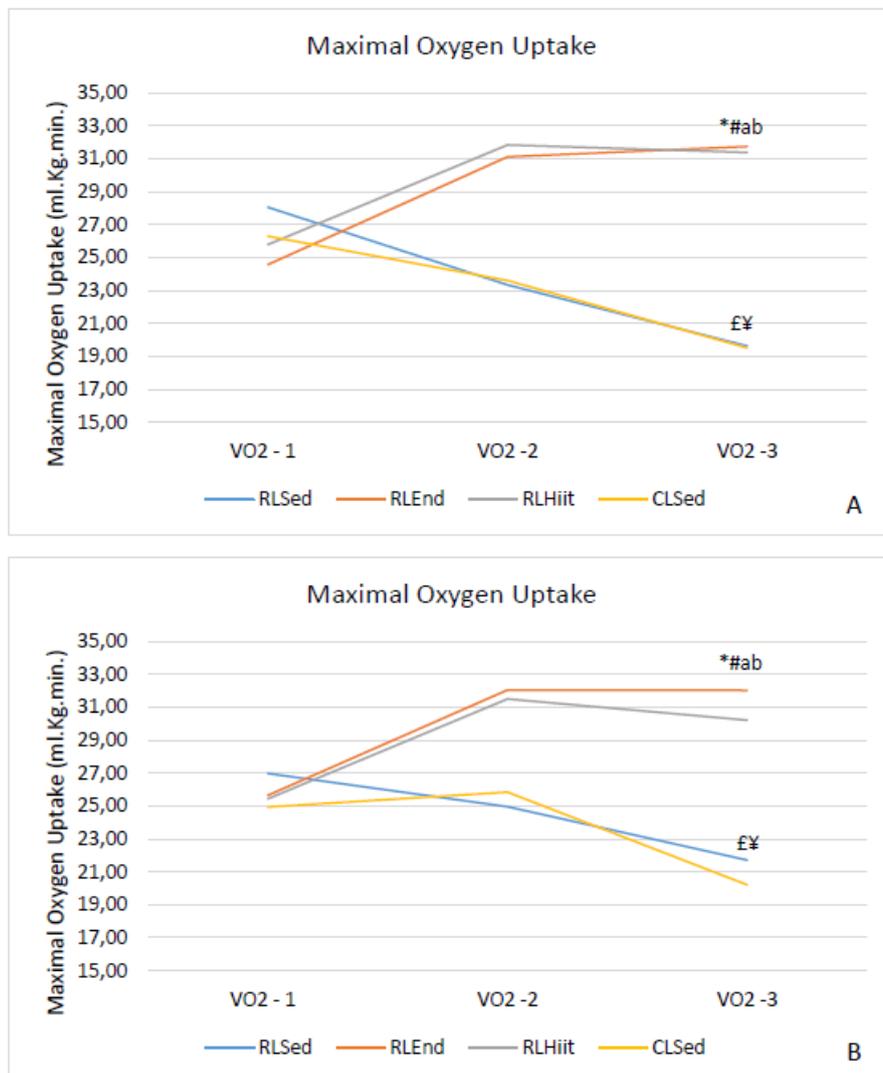
Additional file 1: Figure 1. Study flow chart. RL: reduced litter group; CL: control litter group; HIIT: high intensity interval training.



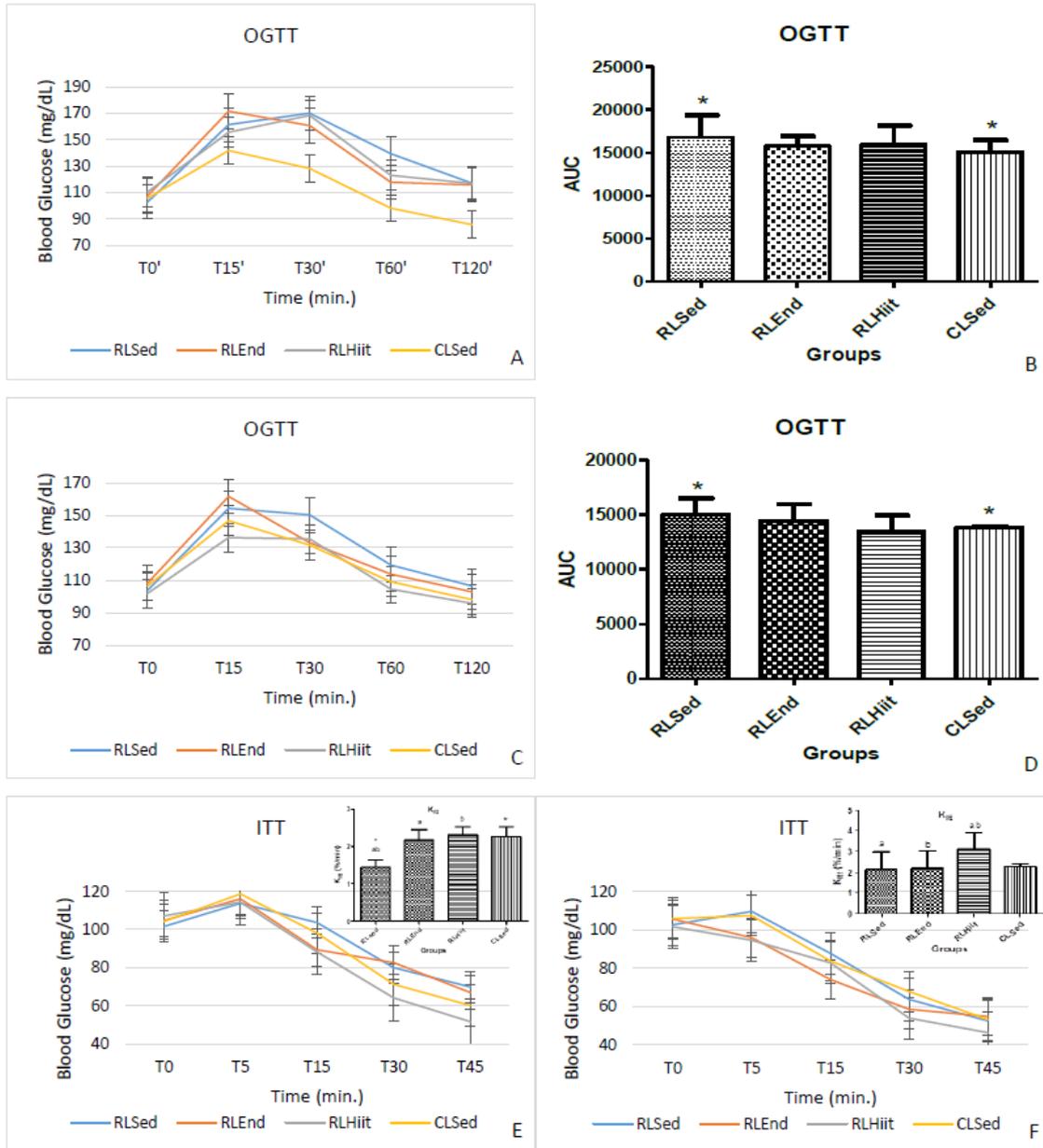
Additional file 2: Figure 2. Male and female body mass and food intake. Male (A) and female (B) body mass before weaning. CLSed, RLSed, RLEnd and RLHIIT male (C) and female (D) body mass after weaning. CLSed, RLSed, RLEnd and RLHIIT male (E) and female (F) food intake after weaning. Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used for both groups for all parameters. *CL and RL intergroup differences; #£¥RL intragroup differences. $p < 0.05$.



Additional file 3: Figure 3. Male (A) and female (B) maximal oxygen uptake (VO_2 max.). Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used in both groups for all parameters. *#£¥intragroup differences at VO_2 max.-1 and VO_2 max.-3; ^{ab}differences between NREnd/NRHiit groups compared to NRSed at VO_2 max.-3. $p < 0.05$.



Additional file 4: Figure 4. Oral glucose tolerance test (OGTT) and Insulin tolerance test (ITT) in males and females. Male OGTT (A) and (B) respective area under the curve; Female (C) OGTT and (D) respective area under the curve; (E) Male ITT and respective K_{itt} ; (F) Female ITT females and respective K_{itt} . ^{ab*}Same letters or symbols: significant differences. $p < 0.05$.



APÊNDICE B – ARTIGO 2 “EFFECT OF POST-NATAL OVERFEEDING ON THE MALE AND FEMALE WISTAR RAT REPRODUCTIVE PARAMETERS”

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO foi aceito para publicação pelo Journal of Developmental Origins of Health and Disease (Qualis B1/fator de impacto 2,21).

EFFECT OF POST-NATAL OVERFEEDING ON THE MALE AND FEMALE WISTAR RAT REPRODUCTIVE PARAMETERS

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

¹ Reproductive Biology Center, 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 a sedentary lifestyle and inadequate eating habits directly contribute to the development of this condition. Studies indicate that rapid weight gain at critical development stages, such as the lactation period, is associated with the development of obesity, cardiovascular diseases and diabetes in the long term. In addition to metabolic changes during adulthood, overweight/obesity may influence reproductive function of the population. In this context, the present study aimed to evaluate post-natal overfeeding effects on male and female Wistar rat reproductive parameters. Postnatal overfeeding was induced by applying the litter reduction method, for both sexes. Forty animals were used, divided into four groups: two with standard litters (SL♂ and SL♀) and two with reduced litters (RL♂ and RL♀). The males were euthanized at 90 days of age, on the same date the females were mated. Females were also euthanized after the 20th day of gestation. Metabolic and reproductive variables were analyzed. Regarding males, RL animals showed increased body mass, adiposity and decreased relative weight of the seminal vesicle, prostate and epididymis, as well as changes in the ITT and OGTT glyceemic tests. Concerning females, RL animals presented increased body mass, relative perigonadal fat weight, glucose intolerance, as well as increased weight of female pup. The litter reduction method was efficient in leading to metabolic and reproductive alterations in male and female Wistar rat.

Key words: Animal reproduction, Postnatal overfeeding, Obesity, Wistar.

INTRODUCTION

Obesity is a complex and multifactorial condition, considered one of the main public health problems today. Excess weight in both children and adults can contribute to the development of serious comorbidities such as diabetes, cardiovascular diseases, hypertension and respiratory problems, thus raising mortality rates associated with obesity (WHO, 2014). In addition, obesity is also related to changes in the reproductive function in both genders, which can lead to infertility and post-pregnancy complications (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015).

To study obesity/overweight control and treatment strategies and/or their comorbidities, experimental methods are used on laboratory animals, involving the consumption of hypercaloric diets, high fat high sugar, cafeteria diets, litter reduction, among others (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006)

The litter reduction method in rodents consists in the reduction of the number of pups, on the second day of postnatal life to three to five animals per mother, aiming at lower competitiveness regarding food resources and, consequently, favoring greater breast milk availability (BEI *et al.*, 2015). Overfeeding during the infancy phase, an important period concerning in the development of various organs and systems, can lead to hormonal dysregulation through epigenetic pathways, with the potential of altering hypothalamic pathway ontogeny, leading to lack of control over energy balance, increased appetite and decreased energy expenditure (PLAGEMANN *et al.*, 1999).

To analyze the effect of early over-nutrition on adult obesity programming, a study was conducted with formula-fed infants, and demonstrated that the magnitude of weight gain during the first week of life may be critical for the development of obesity in adult life (STETTLER *et al.*, 2005). The difference in growth between breastfed and formula-fed infants is higher during the first postnatal weeks, when breastfed infants often lose weight, while formula-fed infants tend to gain weight (SINGHAL; LANIGAN, 2007). These reports support the growth acceleration hypothesis, which proposes that rapid infant growth may alter metabolism and metabolic syndrome components, influencing the development of obesity in adult life (WAHLQVIST *et al.*, 2016b).

In addition to the metabolic alterations generated by infant overfeeding, the reproductive capacity in the adult life of these individuals can also be affected by several stimuli that act during different development stages which can be mediated by alterations in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (ZAMBRANO *et al.*, 2014). In obese individuals, both the physical and molecular structure of spermatozoa can be affected (PALMER *et al.*, 2012).

In addition, studies such as those carried out by Bei *et al.* (BEI *et al.*, 2015) and Sánchez-garrido (SÁNCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2015) demonstrated that the litter reduction method associated to the administration of a high fat diet is able to generate metabolic and overweight disorders in young Wistar rat females, as well as decreases in luteinizing hormone (LH) and estradiol levels in blood by kiss1 gene expression suppression, responsible for LH stimulation/release.

Although metabolic alterations that support the development of obesity in rats from reduced litter have been reported, no studies regarding their effects on the reproductive capacity of this model are available, since overweight/obesity is capable of altering the various mechanisms that act on the reproduction of these animals. Therefore, the aim of this study was to evaluate overfeeding effects induced by the litter reduction protocol on the reproductive parameters of male and female Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Fourteen Wistar rats (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769) were used, 20 males and 20 females, distributed in four experimental groups: one comprising 10 standard litter rats, containing 10 female pups per mother (SL♀), another with 10 rats from a reduced litter, where each mother cared for four female pups (RL♀). The same was carried out with males (SL♂ and RL♂, respectively). The animals were supplied by the breeding laboratory and maintained at the experimental biology laboratory at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Brazil, - CIAEP nº 01,0048,2013 - in ALESCO® microisolators (Brazil) lined with selected non-sterilized shavings, equipped with a wire trough for pellet-type feed and bottle-type polypropylene bottle feeders filled with filtered water.

The cages were maintained in ventilated ALESCO® racks at a controlled temperature of 22 ± 2 ° C. The animals were housed in rooms with controlled light/dark cycle of 12 hours. All procedures were approved by the UFJF Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA / UFJF - protocol no 045/2015).

Litter reduction protocol

On the second postpartum day, offspring from the SL and RL groups were reassigned into four subgroups, two comprising only female offspring (SL♀ and RL♀) and two comprising only male offspring (SL♂ and RL♂), leaving ten females/males for each mother in the SL groups and four females/males for each mother of the RL group. Weaning occurred on the 21st postnatal day, followed by feeding with Nuvital CR 5® commercial feed for all animals.

Body mass food and consumption progress

The body mass of SL and RL animals was recorded weekly from the fourth postnatal day to the 90th day of life. Weight evolution was calculated by the difference between the body masses of the animals measured from a previous week by the subsequent one. Food consumption was also recorded weekly by the difference in weight between the amount of offered food and the remaining amount, 24 hours after food supplying.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

At 90 postnatal days, the animals were submitted to a six-hour fasting period and blood was collected to measure capillary glycemia at T0 (time zero). Subsequently, 2g/kg body weight of a 50% glucose solution were intragastrically administered, and blood samples were then collected at T1 (15 min), T2 (30 min), T3 (60 min), and T4 (120min) (SILVA *et al.*, 2015). The tail lance method was used for blood collection and all samples were analyzed on an AccuChek Advanced capillary gauge (Roche®, Germany).

Insulin tolerance test (ITT)

The ITT was performed one week after the OGTT and also after the six-hour food fast. All animals received SLH insulin (Novolin® N-Novo Nordisk,

Bagsvaerd, Denmark) intraperitoneally at 1 IU/kg body weight after blood glucose measurement at time 0 (baseline) and subsequent times of T5 (5min), T15 (15min), T30 (30min) and T45 (45min) (HIRATA *et al.*, 2003). Blood was collected by the same method described for OGTT.

Female mating

After 90 postnatal days, all females of each group were submitted to mating with breeding males. After confirmation of the proestrus, analyzed by vaginal smears, the males were placed in the female cages at dusk and remained there for 16 hours. Subsequently, the animals were separated and the females submitted to a new vaginal smear procedure. The first day of gestation was confirmed by the presence of vaginal or sperm buffer in the vaginal smears. On the 20th day of pregnancy, females were weighed and euthanized

Euthanasia procedure

All animals were euthanized by cardiac exsanguination following anesthesia and diaphragmatic rupture supplementation - Normative Resolution No. 37 CONCEA (RAUPP, 2018). The anesthetic protocol combined the dissociative anesthetic chetamine hydrochloride at a 90 mg/kg dose (Vetanarcol®, Konig, Brazil) and the sedative and myorelaxant xylazine hydrochloride at a 10 mg/kg dose (Kensol®, Konig, Brazil). The two drugs were mixed and applied intraperitoneally, according to the anesthesia protocol recommended by Wolfensohn and Lloyd (LLOYD; WOLFENSOHN, 1996). A minimum of 5 minutes was allowed prior to diaphragmatic rupture. The weights of the male and female reproductive organs, as well as retroperitoneal and perigonadal fat, were also measured on an analytical scale (Bioprecisa®, specificity of 0.0001g, Brazil) and weight corrected by body weight, establishing the relative weight for each animal.

Reproductive analyses

Males:

Testicular descent and differentiation of penile gland morphology

At 15 postnatal days, animals were monitored daily to check testicular descent. At 25 postnatal days, differentiation of the penile gland morphology was also monitored, identifying the day of the appearance of the three differentiation phases (A, B and C), observed according to Yamasaki et al. (YAMASAKI *et al.*, 2001), Phase A is characterized by a projecting structure in the penis gland, which begins with a gradual change to a W shape (phase B), and a subsequent change from the W shape to a flattened surface (phase C).

Sperm counts

Spermatozoa were collected from epididymal secretions through a small incision of the tail of the left epididymis. Secretions were placed in 50 μ L of a PBS buffer solution (Sigma[®]) and mixed. After homogenization with PBS, a 20 μ L aliquot was removed and placed in 6 mL of distilled water to immobilize the spermatozoa (dilution 1:300) for counting on a Neubauer chamber, using a model BH-2 optical microscope (Olympus[®], Japan) at 40x magnification. The mean sperm count values of the four lateral quadrants on both sides of the chamber were considered to calculate the sperm concentrations using the formula:

Sperm concentration (sptz/mL) = Means x 300 x 10⁴.

Evaluation of spermatic vitality

Spermatozoon smears were performed and stained by the Nigrosina eosin technique (WHO, 2010), where two hundred spermatozoa from each animal, classified as living or dead, were evaluated under a BH-2 optical microscope (Olympus[®]-Japan), at 1000x magnification. Data were expressed as percentage of live spermatozoa.

Sperm morphology evaluation

Spermatozoa smears were obtained and stained by the Shorr technique for the determination of the abnormality index and morphological classification, (WHO, 2010). A total of 200 spermatozoa were analyzed and classified as normal or abnormal using a BH-2 optical microscope (Olympus[®], Japan) at 1000x magnification. Abnormal alterations comprised head (amorphous) and

tail (broken and coiled) defects, according to Seed et al. (SEED *et al.*, 1996) and Oshio et al. (OSHIO *et al.*, 2015).

Histometric analyses

The right epididymis and right testis were used for the histometric analyses. The epididymis was fixed in Bouin for 24 h. The testis was fixed in a modified Karnovsky fixative (4% paraformaldehyde: 4% glutaraldehyde in 0.1 mL/L phosphate saline buffer, pH 7.4). The organs were included in paraffin, sectioned at 5 µm thickness for epididymide Gomori trichrome staining and testicle hematoxylin and eosin staining. The height of the epididymis epithelium was determined from four measurements per tubule in 10 transverse tubules/animal in the initial segment and in the epididymis caudal area. Mean tubule epithelium height was calculated and six animals per group were analyzed. The epithelium height of the seminiferous tubule was determined by calculating the means of four opposite measurements (basal lamina to the last nucleated round spermatid). The luminal diameter was calculated by the difference between the total diameter and the sum of two horizontal epithelium heights. The most circular tubules of six testicles per group were analyzed, totaling 20 tubules per animal. Histological sections were photographed using an AXIOPHOT HBO50 (Zeiss®) optical microscope with a coupled camera (AXIOCAM ICc3, Zeiss®). The Image Pro Plus® version 6 software was used for the measurements.

Females:

Vaginal opening

From the 21st postnatal day, females of both groups were inspected daily for vaginal membrane rupture.

Dissection, female organ weighing and fetal analyses

After euthanasia, necropsy and removal of right and left ovaries were carried out in the mothers. Luteal bodies were counted using a stereoscopic Steime SV-6 microscope (Zeiss®, Germany) and the total number of implants and resorptions in the uterine horns were quantified.

Uteri were weighed with contents and the final body mass of the mothers was considered by calculating the difference between the weights obtained before euthanasia and the weights of the uterus with contents. Weights and the number of live and dead fetuses and their respective placentas were also obtained and separated by sex. Fetal nasal length was determined with a digital caliper.

After fetus euthanasia, external morphologies were analyzed, considering upper and lower limbs morphology and the presence or absence of polydactyly and syndactyly. The presence of cranioschisis, micro or anophthalmia, cleft palate, cleft lip and macro or microglossia were also assessed in the skulls (MT *et al.*, 2010). All analyses were carried out with a Steime SV-6 microscope (Zeiss®, Germany).

The following indices were calculated: gestation = (total number of mated females that remained pregnant/number of not pregnant mated females) x 100; implantation = (total number of deployments/total number of corpora lutea) x 100; birth = (total number of fetuses/total number of implantation) x 100; pre-implantation losses = (total number of corpora lutea - total number of implantations/total number of corpora lutea) x 100; fetal malformations = (total number of malformations/total number of fetuses) x 100 (BALASINOR *et al.*, 2002).

Statistical analyses

The Shapiro-Wilk test was performed to verify data normality. Comparisons between the SL and RL groups were carried out using Student's t test or the Mann Whitney test for parametric or non-parametric data, respectively. OTGG results were obtained by calculating the total area under the glycemic curve. Significance levels were set at $p < 0.05$. All analyses were performed using the SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) programs, Summer 21 (New York, USA) and Graphpad Prism® - Version 5 (La Jolla, USA) softwares.

RESULTS

The body mass of RL males prior to weaning was significantly higher from the 4th day of life when compared to SL animals and was maintained after weaning in all evaluated timeframes (Figure 1). In females, this difference was detected from the 10th postnatal day until weaning, also remaining at all evaluated points after timeframes (Figure 1).

As displayed in Figure 1, RL males presented significantly higher feed intake than SL. Regarding SL and RL female feed intake, a significant increase in the RL group was observed in relation to SL animals.

Regarding body mass after weaning, both RL males and females presented significantly higher values when compared to their respective SL groups (Figure 1).

Adiposity was significantly higher in RL males when compared to SL males, with a 26% increase for relative perigonadal fat weight, and 58% for retroperitoneal fat. In females, a significant difference in the relative weight of the perigonadal adipose tissue compared to the RL group was noted, with a 45% increase when compared to the SL group. Although no significant difference in the relative weight of retroperitoneal adipose tissue in females was observed, the means of the RL group was 31% higher when compared to the means of the SL group.

Figure 2 also displays the OTGG results for SL males and females compared to the RL groups. The mean area under the RL males curve was 11.2% higher compared to the SL animal results. A significant difference was also detected for female OTGG results, with the RL group presenting mean area under the curve 9% higher compared to the SL group.

Regarding the male reproductive analyses, no differences were noted for testes descent or gland morphology (Figure 4) between the SL and RL groups. Concentration, vitality and sperm morphology were also not statistically different (Figure 4), although RL animals presented a 10.52% reduction in the relative weight of the epididymis, a 12.5% decrease for the seminal vesicle and a 13.3% decrease in prostate weight compared to the SL animals (Figure 4). Also presents a significant difference on the vaginal opening in period in RL females of in comparison to the control group.

Regarding histometry, no significant alterations of the seminiferous tubule and epididymis were observed between SL and RL animals (Figure 4).

Figure 5 present the results of the assessed female reproductive variables, where the first sought to evaluate their reproductive capacity through gestational indexes, and the second aimed at fetal analyses, with a significant difference in the weight of female fetuses between the RL and SL groups.

DISCUSSION

The litter reduction method in rats simulates the nutrition of human infants who feed on formulas, since less competition during breastfeeding allows for offspring overfeeding. Some of the overweight/obesity pathophysiological mechanisms and their complications can be clarified through this model, since it is known that the weight gain during the first postnatal weeks is related to the disease development and its comorbidities (STETTLER *et al.*, 2005).

Our findings indicate that males exposed to overfeeding during the lactation period present higher feed intake, body mass, retroperitoneal and perigonadal fat and glucose intolerance as adults, demonstrating that the litter reduction model for the study of overnutrition effects is effective for long term overweight/obesity induction, also reported by Plagemann *et al.* (PLAGEMANN *et al.*, 1999), Boullu-Ciocca *et al.* (BOULLU-CIOCCA *et al.*, 2005) and Collden *et al.* (COLLDEN *et al.*, 2015).

In males, obesity is associated with low levels of total testosterone due to decreased levels of Sexual Hormone Binding Globulin (SHBG), since testosterone binds with high affinity to this globulin, with 98% of circulating testosterone bound to SHGB or albumin and 2% is in its free form (KOKKORIS; PI-SUNYER, 2003). As a consequence, the ratio of free testosterone to total testosterone is higher in obesity conditions, and the total dosage of this hormone is subject to fluctuations induced by the quantitative variations of carrier proteins, especially SHBG (VIEIRA *et al.*, 2008).

Thus, when analyzing glycemic metabolism in RL males, a lower insulin sensitivity in the ITT test was noted, with insulin resistance being a subnormal response in glucose uptake by cells, especially in muscle and fatty cells. As a consequence of lower glucose uptake, higher insulin synthesis is necessary for

the maintenance of normal glycemic levels, thus increasing circulating insulin levels, therefore, accompanied by hyperinsulinemia (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006), a condition present in overweight/obese individuals and related to decreased SHBG (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015), consequently decreasing testosterone transport.

In addition, RL males presented decreased epididymis, seminal vesicle and prostate weights. Circulating testosterone linked to carried proteins (SHBG and albumin), upon entering the cell can be converted into DHT by the action of 5-alpha-reductase on target tissues (epididymis, seminal vesicles and prostate), DHT is the primary androgen effector in such tissues, so decreased tissue weight may be related to DHT formation inhibition or the low circulation of SHBG-bound testosterone due to hyperinsulinemia as a consequence of increased peripheral insulin resistance, as shown in the ITT results for the RL group. Depending on the severity of the response, this may or may not be detectable microscopically (OECD, 2001). Herein, epididymis histomorphometry of overfed animals was unaltered.

Free testosterone is the biologically active hormone necessary for normal spermatogenesis (KOKKORIS; PI-SUNYER, 2003), however, inhibition of DHT formation or decreased SHBG concentrations have morphological effects on spermatogenesis. Testosterone levels were not measured herein, but our findings indicate that overfeeding in infancy does not lead to changes in the spermatogenic process, in testicular weight or in the sperm analyses carried out, indicating that free testosterone concentrations would not have been altered.

Data from the literature with respect to obesity associated with spermatogenesis are controversial. A review by Cabler et al. (CABLER *et al.*, 2010), in both humans and animals, demonstrated the relationship between obesity and decreased sperm concentration, abnormal morphology, compromised chromatin integrity and abnormal motility. Studies that correlate BMI and sperm concentrations are discrepant, as some demonstrate associations and others do not (AGGERHOLM *et al.*, 2008; BAKOS *et al.*, 2011; JENSEN, TINA KOLD *et al.*, 2004; PAASCH *et al.*, 2010). On the relationship between BMI and sperm morphology MacDonald et al. (MACDONALD *et al.*,

2010) carried out a systematic meta-analysis review, and concluded that the evidence that allows a link between concentration parameters and sperm morphology with BMI are insufficient, in our findings, overfed animals showed no alterations in spermatic parameters.

On the other hand, according to the literature, several studies have demonstrated that obesity in females is associated with metabolic alterations (CUNHA *et al.*, 2009; PLAGEMANN *et al.*, 1999; SHENG, 2000), as well as reproductive disorders (JOHANSSON *et al.*, 2014; STOTHARD *et al.*, 2009), reducing not only the quality of life of the animals, but also maternal health and that of their descendants,

When analyzing females overfed precociously significant increases in body mass and in food consumption are noted, corroborating the findings reported by Cunha *et al.* (CUNHA *et al.*, 2009), who demonstrated an increase in milk consumption in Wistar females from reduced litters, inducing excess weight in their offspring. In addition, RL females also presented increased perigonadal fat when compared to SL females.

Our findings also indicated that overfed females presented glucose intolerance, corroborating the findings reported by Plagemann *et al.* (PLAGEMANN *et al.*, 1999), Balonan; Sheng (SHENG, 2000); Cunha *et al.*, (CUNHA *et al.*, 2009), who, when analyzing other maternal overfeeding models, observed that maternal nutritional changes are related not only to the possible modifications in their metabolism, but also to the occurrence of future reproductive alterations, with deleterious effects on offspring development (BIHOREAU *et al.*, 1986).

Studies such as those carried out by Stothard *et al.* (STOTHARD *et al.*, 2009) and Johansson *et al.* (JOHANSSON *et al.*, 2014) demonstrated several negative effects of maternal obesity on fetal development, such as congenital anomalies, asphyxia at birth and other neonatal morbidities. However, the consequences of nutritional alteration caused by overfeeding in animals from a reduced litter have not yet been completely elucidated.

With respect to maternal reproductive development, a significant delay in the vaginal opening period was observed in overfed females when compared to the control group, indicating a possible delay in puberty onset, disagreeing with the findings reported by Caron *et al.* (CARON; CIOFI; PREVOT, 2013), who

analyzed isogenic mice, and observed early vaginal opening onset of obese females, obtained applying the litter reduction process, as well as those reported by Biro et al. (BIRO *et al.*, 2006) and Solorzano and McCartney (SOLORZANO; MCCARTNEY, 2011) who also observed early puberty onset in obese females. These changes can lead to variations in the reproductive axis, including decreased fertility (BREWER; BALEN, 1978; DONNELLY *et al.*, 2009).

A non-significant increase was observed in the reproductive profile of overfed females in the present study concerning certain parameters, such as weight of male fetuses, placenta and size (nasoanal length) in both sexes. However, only female fetus weight displayed a significant increase when compared to the control group, evidencing possible maternal metabolic alterations and consequences on the development of their offspring. These consequences may be related to the development of an energetically saturated intrauterine environment in mothers who present body fat accumulation and insulin resistance (BIHOREAU *et al.*, 1986), thus exposing fetuses to high amounts of nutrients, leading to accelerated body development, altering the onset of sexual maturity and the development early metabolic diseases and associated comorbidities (MANDÒ *et al.*, 2016; REGNAULT *et al.*, 2013).

In addition, female reproductive capacity parameters in the present study, such as pregnancy rates, implantation, pre-implantation losses, and amounts fetal malformations were not statistically different from the controls.

According to the literature and corroborated by the findings reported herein, the negative influence of overweight/obesity on animal metabolism and reproduction verified by different nutritional alteration models, is well established. However, these disorders may vary according to sex and sex hormones play an important role in the morphodynamics of obesity and its comorbidities, potentially capable of influencing the amount of food intake and consequent body weight gains (WANG, 1925). Male rodents present higher food intake and intake of kilocalories per gram of body weight when compared to females (ASARIAN; GEARY, 2013).

In addition, it has been observed that females suffer less disturbance than males, which may be related to genetic factors derived from sexual dimorphism, where a more significant and accelerated DNA methylation in paternal pro-

nuclei seems to occur when compared to maternal pro-nuclei (SANTOS *et al.*, 2005; SANZ; KOTA; FEIL, 2010).

However, in offspring of obese mothers, it is observed that, although males may suffer developmental alterations, since they may present decreased placenta sizes and, consequently, greater susceptibility to maternal organism and intrauterine environment disturbances (KIM *et al.*, 2014; VAN ABEELLEN *et al.*, 2011). Female pups appear to undergo greater changes than males, possibly due to changes in mitochondrial DNA, as well as the influence of sex hormones, such as estrogen, in the dysregulation of the insulin-glucose axis and the presence of mitochondrial dysfunction (MURALIMANOHARAN, GUO, 2012; SABEN *et al.*, 2017; TAYLOR, 2004; ZHOU *et al.*, 2018).

In summary, the litter reduction protocol was effective in altering metabolic and reproductive patterns in male and female Wistar rats.

CONCLUSIONS

The litter reduction protocol, applied according to the specificities of the present study, was able to alter the relative weight of the epididymis, seminal vesicle and male prostate, as well as modify the vaginal opening and weight of female fetuses in Wistar rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Centro de Biologia da Reprodução e Laboratório de Fisiologia Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

FINANCIAL SUPPORT

Redes Mineiras de Bioterismo (CVZ RED - 00009/14) e Toxicologia e Farmacologia (CBB RED - 00008/14) - Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas de Gerais – FAPEMIG - Minas Gerais, Brasil.

CONFLICTS OF INTEREST

None

ETHICAL STANDARDS

None

REFERENCES

1. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Health. 2014;176.
2. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Obesity and reproduction: A committee opinion. Fertil Steril [Internet]. Elsevier; 2015;104(5):1116–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.018>
3. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):190–7.
4. Bei F, Jia J, Jia Y, Sun J, Liang F, Yu Z, et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. Lipids Health Dis [Internet]. Lipids in Health and Disease; 2015;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0094-2>
5. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, 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 Res. 1999;836(1–2):146–55.
6. Zambrano E, Guzmán C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. Fetal programming of sexual development and reproductive function. Vol. 382, Molecular and Cellular Endocrinology. 2014. p. 538–49.
7. Palmer NO, W. Bakos H, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. Spermatogenesis. 2012;2(4):253–63.
8. Sánchez-Garrido MA, Ruiz-pino F, Manfredi-lozano M, Leon S, Heras V, Castellano JM, et al. Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female : Influence of the Loss of Ovarian Secretion. 2015;156(August):2984–98.
9. Silva A, Santos M, Franca S, Silva V, SIlva L, Figueiredo U, et al. Acute and Subchronic Antihyperglycemic Activities of Bowdichia virgilioides Roots in

- Non Diabetic and Diabetic Rats. *J Intercult Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;4(1):1. Available from: <http://www.scopemed.org/?mno=171784>
10. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Campello Carvalheira JB, De Oliveira Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci*. 2003;73(11):1369–81.
 11. Raupp MA. Resolução normativa no 13, de 20 de setembro de 2013. 2018;1–19.
 12. Lloyd MH, Wolfensohn SE. Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. *Lloydia (Cincinnati)*. 1996;(Orlans):48–53.
 13. Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takatsuki M. Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj: CD (SD) IGS rats. *Reprod Toxicol*. 2001;15(5):533–6.
 14. WHO. Examination and processing of human semen. WHO Press [Internet]. 2010;5th Editio:286. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
 15. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hur= ME, et al. Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reprod Toxicol*. 1996;10(3):237–44.
 16. Oshio LT, Ribeiro CCT, Marques RM, Guerra M de O, da Matta SLP, Reis JE de P. Effect of Ginkgo biloba extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. *J Med Plants Res* [Internet]. 2015;9(5):122–31. Available from: <http://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/F38DD1450673>
 17. Mt Y, Ao A, At O, Ma A, Ob O, Ga J, et al. Abortifacient Potential of Aqueous Extract of Senna alata Leaves in Rats. *J Reprod Contracept*. 2010;21(3):163–77.
 18. Balasinor N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N, Juneja HS. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;190(1–2):159–66.
 19. Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, Zhao J, Schinnar R, Nelson SE, et al. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: A cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation*. 2005;111(15):1897–903.

20. Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2005;54(1):197–203.
21. Collden G, Balland E, Parkash J, Caron E, Langlet F, Prevot V, et al. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab*. 2015;4:15–24.
22. Kokkoris P, Pi-Sunyer FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32(4):895–914.
23. Vieira JGH, Nakamura OH, Ferrer CM, Tachibana TT, Endo MHK, Carvalho VM. Importância da metodologia na dosagem de testosterona sérica: comparação entre um imunoensaio direto e um método fundamentado em cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tandem (HPLC/MS-MS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):1050–5.
24. OECD Series. The Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology ENV / JM / MONO (2001) Unclassified. Development. 2001;(1):1–25.
25. Cabler S, Agarwal A, Flint M, Du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl*. 2010;12:480–9.
26. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body weight index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*. 2004;82(4):863–70.
27. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril*. 2008;
28. Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, Glander HJ. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;94(7):2898–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.047>
29. Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body weight index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;95(5):1700–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.044>

30. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body weight index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2010;16(3):293–311. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmp047>
31. Sheng H and, C. BL. Perinatal Feedings Adversely Affect Lipogenic Activities but Not Glucose Handling in Adult Rats. 2000;48(5):668–73.
32. de Souza Rodrigues Cunha AC, Pereira RO, dos Santos Pereira MJ, de Melo Soares V, Martins MR, Teixeira Teixeira M, et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;20(6):435–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.002>
33. Stothard KJ, Tennant PWG, Bell R, Rankin J. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies. *Jama* [Internet]. 2009;301(6):636. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2009.113>
34. Johansson S, Villamor E, Altman M, Bonamy A-KE, Granath F, Cnattingius S. Maternal overweight and obesity in early pregnancy and risk of infant mortality: a population based cohort study in Sweden. *Bmj* [Internet]. 2014;349(dec02 6):g6572–g6572. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.g6572>
35. Bihoreau MT, Ktorza A, Kinebanyan MF, Picon L. Impaired glucose homeostasis in adult rats from hyperglycemic mothers. *Diabetes*. 1986;35(9):979–84.
36. Caron E, Ciofi P, Prevot V BS. *NIH Public Access*. 2013;27(3):200–7.
37. Biro FM, Khoury P, Morrison JA, Anderson R, Biro F, Von Eyben FE, et al. Influence of obesity on timing of puberty. *Int J Androl*. 2006;29(1):272–7.
38. Solorzano CMB, McCartney CR. *NIH Public Access. Nih*. 2011;140(3):399–410.
39. Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(2):459–71.

40. Brewer CJ, Balen AH. Focus on Obesity The adverse effects of obesity on conception and implantation. 1978;
41. Regnault N, Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Eggleston E, Oken E. Sex-specific associations of gestational glucose tolerance with childhood body composition. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3045–53.
42. Mandò C, Calabrese S, Mazzocco MI, Novielli C, Anelli GM, Antonazzo P, et al. Sex specific adaptations in placental biometry of overweight and obese women. *Placenta*. 2016;38:1–7.
43. Wang GH. The changes in the amount of daily food-intake of the albino rat during pregnancy and lactation. American Physiological Society. 1925; 736-741.44.
- Asarian L, Geary N. Sex differences in the physiology of eating. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2013;305(11):R1215–67. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00446.2012>
45. Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol*. 2005;280(1):225–36.
46. Sanz LA, Kota SK, Feil R. Genome-wide DNA demethylation in mammals. *Genome Biol*. 2010;11(3).
47. Van Abeelen AFM, De Rooij SR, Osmond C, Painter RC, Veenendaal MVE, Bossuyt PMM, et al. The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. *Placenta* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(9):694–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.012>
48. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL. Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse¹. *Biol Reprod* [Internet]. 2014;90(6):1–11. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.113.117259>
49. Taylor PD. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004;288(1):R134–9. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00355.2004>

50. S Muralimanoharan, C Guo LM and AM. NIH Public Access. 2012;39(2):123–30.
51. Saben JL, Boudoures AL, Asghar Z, Thompson A, Drury A, Zhang W, et al. HHS Public Access. 2017;16(1):1–8.
52. Zhou Z, Ribas V, Rajbhandari P, Drew BG, Moore TM, Fluit AH, et al. Estrogen receptor protects pancreatic β -cells from apoptosis by preserving mitochondrial function and suppressing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2018;293(13):4735–51.

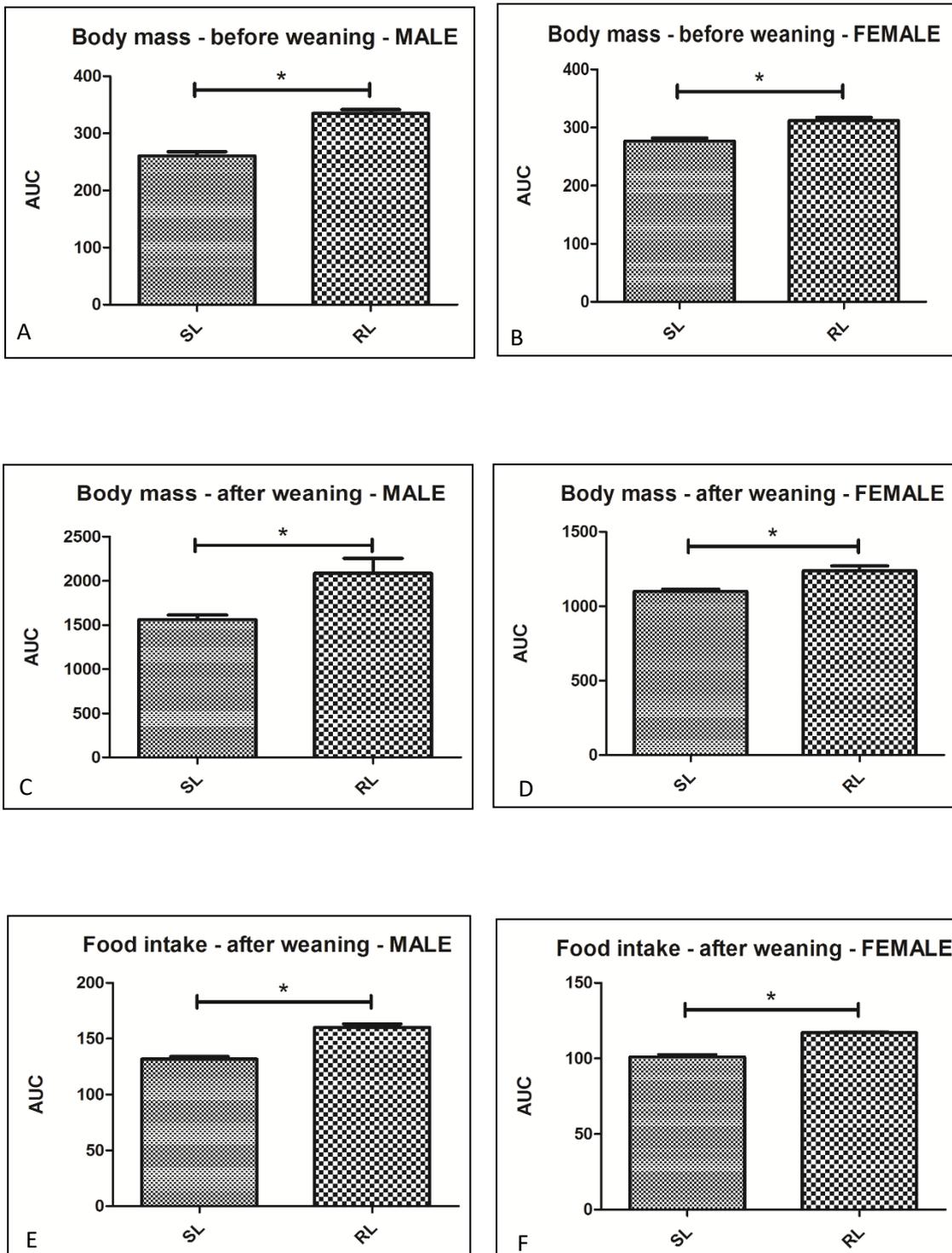


FIGURE 1: Male and female body mass and food intake. Male (A) and female (B) body mass before weaning. SL, RL male (C) and female (D) body mass after weaning. SL, RL male (E) and female (F) food intake after weaning. Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used for both groups for all parameters. *SL and RL intergroup differences. $p < 0.05$.

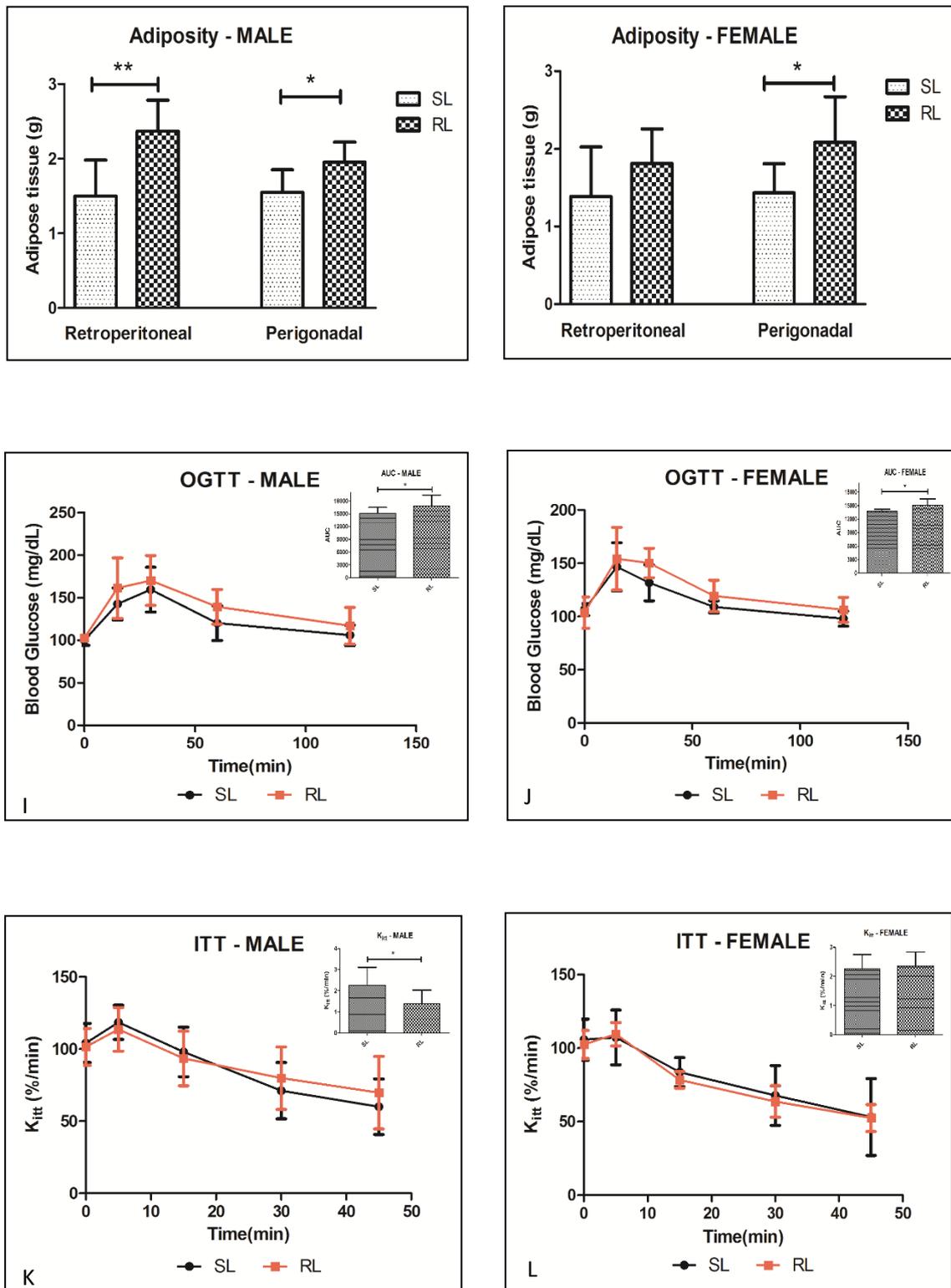


FIGURE 2: Relative weight of retroperitoneal and perigonadal adipose tissue in males and females. Oral glucose tolerance test (OGTT) and Insulin tolerance test (ITT) in males and females. Male OGTT (I) and respective area under the curve; Female (J) OGTT and respective area under the curve; (K) Male ITT and respective K_{itt} ; (L) Female ITT females and respective K_{itt} . Results are presented as means and standard deviation. Ten rats were used for both groups for all parameters. ***SL and RL intergroup differences. $p < 0.05$.

Sex	Corporal parameters		SL (n=10)	RL (n=10)
	Testicular descent		25.0 ± 1.41	24.5 ± 2.41
Male	Penile gland morphology	Phase A	29.5 ± 2.22	29.2 ± 2.09
		Phase B	39.6 ± 1.9	38.3 ± 0.67
		Phase C	45.9 ± 2.08	44.4 ± 1.26
Female	Vaginal opening		35.3 ± 4.35	36.41 ± 4.56*

FIGURE 3: Results are presented as means and standard deviation. *SL and RL intergroup differences. $p < 0.05$.

	SL♂ (n=10)	RL♂ (n=10)	
Relative weight of organs (g)			
Testicles [#]	1.29 ± 0.12	1.38 ± 0.10	
Epididymis	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01*	
Seminal vesicle	0.50 ± 0.06	0.42 ± 0.05*	
Ventral prostate	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02*	
Histometry (µm)			
<i>Right testicle</i>			
Height of the epithelium	40.73 ± 3.83	42.72 ± 2.01	
Lumen diameter	169.8 ± 9.3	182.76 ± 12.12	
Totaldiameter	258.91 ± 10.59	271.77 ± 15.03	
<i>Epididymis</i>			
Height of the epithelium	Initial segment	25.78 ± 4.2	26.28 ± 6.86
	Distal segment	14.78 ± 1.74	14.84 ± 1.29
Sperm			
Concentration (10 ⁶ /mL)	17578.95 ± 6135.20	17111.25 ± 6860.74	
Vitality (% alive)	88.19 ± 7.45	84.65 ± 7.10	
Morphology (% normal)	89.79 ± 4.95	92.30 ± 4.16	

Figure 4: Evaluation of organs weight, histometry and spermatic in animals of the standard litter group (SL) compared to the reduction litter group (RL). Results are presented as means and standard deviation. [#]Absolute weight of the testicles. *SL and RL intergroup differences. $p < 0.05$.

	SL♀ (n=10)	RL♀ (n=9)
Maternal Index		
Gestation	100 (10/10)	100 (9/9)
Implantation	91 (82/91)	92 (95/103)
Birth	91,5 (75/82)	98 (93/95)
Pre-implantation loss	10 (91-82/91)	8 (103-95/103)
Fetal malformations	7.7 (7/91)	8.7 (9/103)
Fetuses Parameters		
Weight of male fetuses	2.18 ± 0.19	2.32 ± 0.11
Weight of males' placenta	0.44 ± 0.06	0.48 ± 0.03
NAL of male fetuses	3.25 ± 0.12	3.39 ± 0.14
Weight of female fetuses	1.93 ± 0.33	2.26 ± 0.27*
Weight of females' placenta	0.42 ± 0.04	0.46 ± 0.01
NAL of female fetuses	3.19 ± 0.10	3.20 ± 0.17

Figure 5: Evaluation of gestation, implantation, birth, pre-implantation losses indexes (%), as well as fetal malformations, naso-anal length (NAL), placental and fetus weights in animals of the normal litter group (SL) compared to the small litter group (RL). Results are presented as means and standard deviation. *SL and RL intergroup differences. $p < 0.05$.

APÊNDICE C – RESUMOS

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.

BACKGROUND: Overweight/obesity is considered a risk factor for cardiovascular and metabolic diseases and it impacts directly on the population's quality of life and longevity. Researches with animal model have been adopted for a better understanding of the pathophysiology and treatment of this comorbidity. This condition can be induced by litter size reduction or hypercaloric diets and, replicates the nutritional profile of the current population.

AIM: To evaluate the effectiveness of litter size reduction and hypercaloric diet on overweight induction and changes on glucose metabolism in rats obtained from Centro de Biologia da Reprodução/UFJF (CIAEP 0100482013).

METHODS: Twenty-eight females were divided into 3 groups and followed from birth to 100th-days-old: control litter (CL), 8-12 animals/litter (n=10), reduced litter (RL), 4 animals/litter (n=10) and treated with control diet; hypercaloric diet litter (HDL), 8-12 animals/litter (n=8), treated with hypercaloric diet. All animals were submitted to an oral glucose tolerance (OGTT) and insulin tolerance tests (ITT). At 100th-days-old days of age, the animals were weighted, euthanized and the retroperitoneal and perigonadal fats were collected. **RESULTS:** The CL presented lower average body mass (168±9.5g) than the averages RL (191±7.5g) and HDL (197±12.5g) (p<0.05). Fat mass was higher in RL (7.6±2g) regarding to CL (5.5±1.4g) and HDL (5.3±1.5g) (p<0.05). The HDL showed lower glucose clearance in OGTT, represented by a larger area under the curve (16270±1600) compared to CL (13910±1880) and RL (14150±1340) (p<0.05). The plasma glucose disappearance rate constant (K_{ITT}) in ITT did not differ between groups. **CONCLUSION:** The models were effective to induce overweight in females at 100th-days-old compared to CL. The HDL showed higher change in glucose metabolism during the OGTT compared to other groups.

KEYWORDS: obesity; overweight; metabolism; litter size reduction; hypercaloric diet

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS MODELOS PARA INDUÇÃO DE OBESIDADE EM CRIAS DE RATAS WISTAR.

Carlos Gabriel de Lade¹, Vera Maria Peters¹, Marcella Martins Terra¹, Ana Eliza Andreazzi², Martha de Oliveira Guerra¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora. ²Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Email: lade.gab@gmail.com

INTRODUÇÃO - Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o rápido ganho de peso na infância está associado ao desenvolvimento da obesidade

infantil e em jovens adultos em diversas populações, sendo que a fase da lactação pode ser considerada um período crítico para alterações futuras do estado nutricional e hormonal da prole. Em pesquisas relacionadas à obesidade, suas possíveis causas e tratamentos, estudos experimentais têm sido amplamente utilizados. Os modelos que mais se aproximam do que ocorre em humanos são os que induzem o aumento do peso através dietas hipercalóricas e a redução de ninhada, que se assemelha à ingestão calórica excessiva pelos lactentes. **OBJETIVO** - Comparar a eficácia da indução do sobrepeso/obesidade de crias através dos modelos de redução de ninhadas e dieta hipercalórica em ratas Wistar do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF. **MÉTODOS** - Cinquenta e duas fêmeas Wistar foram divididas em três grupos e acompanhadas do nascimento ao 90° dia: ninhada controle (NC), 8-12 animais/ninhada (n = 20) e tratados com ração controle*; ninhada reduzida (NR), 4 animais/ninhada (n = 20) e tratados com ração controle*; ninhada dieta hipercalórica (NDH), 8-12 animais/ninhada (n = 12) e tratados com ração hipercalórica**. A evolução do peso corporal e consumo alimentar foram acompanhados durante 90 dias a partir do desmame (21° dia), semana a semana. **RESULTADOS** - O grupo NR apresentou média de peso corporal ($36,12 \pm 2,54$ g) e consumo alimentar (4,0 g/dia) superiores aos grupos NC ($33,5 \pm 3,59$ g; 3,2 g/dia) e NDH ($31,4 \pm 3,65$ g; 2,6 g/dia) já no desmame, com diferenças significativas ($p < 0,05$). As médias de peso corporal e consumo alimentar do grupo NR aos 90 dias ($173,7 \pm 8,8$ g; 13,4 g/dia) foram superiores quando comparados com as médias dos grupos NC ($160 \pm 8,5$ g; 12,4 g/dia) e NDH ($163,9 \pm 13,9$ g; 10 g/dia), com diferenças significativas, inclusive com médias superiores em todos os pontos de medidas durante 90 dias ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO** - O método de redução de ninhadas mostrou-se mais eficiente para indução de sobrepeso/obesidade nas crias quando comparado com o modelo tradicional, cujo as crias foram submetidas a uma dieta hipercalórica, o que credencia o modelo a ser utilizado em estudos experimentais do sobrepeso/obesidade nos animais da colônia do CBR/UFJF. **CEUA/UFJF**: 045/2015. **Suporte Financeiro**: Rede Mineira de Bioterismo - FAPEMIG. Rede TOXIFAR - FAPEMIG.

*Nuvital® (Curitiba, Brasil); **PragSoluções® (Jaú, Brasil).

EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO DURANTE A LACTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROMOTOR DE MACHOS WISTAR.

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

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

INTRODUÇÃO: O sobrepeso/obesidade é considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas, impactando diretamente na qualidade de vida da população. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o rápido ganho de peso na infância está associado ao desenvolvimento da obesidade infantil e jovens adultos em diversas populações, sendo a fase de lactação considerada um período crítico para alterações futuras do estado nutricional e hormonal da prole. Além disso, durante esse período, fatores como o excesso nutricional pode interferir no desenvolvimento físico e

neuromotor da prole. Em modelos experimentais, a superalimentação durante a lactação pode ser induzida pelo método de redução de ninhada. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da superalimentação na lactação no desenvolvimento físico e neuromotor de filhotes Wistar machos provenientes de ninhadas reduzidas, obtidas no biotério do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF (CIAEP 0100482013). **MÉTODOS:** CEUA/UFJF: 045/2015.60 filhotes Wistar machos foram utilizados no estudo e distribuídos em: ninhada padrão (NP), composta por 10 animais/ninhada e ninhada reduzida (NR) por 4 animais/ninhada. O remanejamento dos filhotes para a formação das ninhadas ocorreu no segundo dia pós-natal, sendo desmamados no 21º dia de vida. Os animais foram pesados nos dias 4, 10, 15, 20, 21 e 25. Além disso, a partir do segundo dia de vida, foram avaliados quanto ao desenvolvimento físico através da observação da abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos e descida dos testículos. O desenvolvimento neuromotor foi avaliado através dos testes de preensão palmar, orientação, esquivar ao abismo e geotaxia negativa. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação das variáveis quantitativas, enquanto que as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Qui Quadrado. O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Os dados são apresentados na sequência NP (n=31) e NR (n=29). Com relação ao desenvolvimento físico, foram observadas diferenças significativas no descolamento de orelhas ($4,41 \pm 0,50$ e $4,65 \pm 0,55$), aparecimento de incisivos tanto superior ($9,54 \pm 1,09$ e $9,34 \pm 0,97$), quanto inferior ($11,25 \pm 0,68$ e $11,06 \pm 0,99$), além de descida de testículo ($25,22 \pm 1,85$ e $24,31 \pm 2,08$). Também houve diferenças significativas em alguns reflexos neuromotores, tais como resposta postural ($2,03 \pm 0,17$ e $2,17 \pm 0,46$), geotaxia negativa ($7,67 \pm 2,28$ e $7,48 \pm 2,06$) e orientação ($7,77 \pm 1,99$ e $6,58 \pm 2,09$). Além disso, ocorreu diferença significativa na massa corporal entre NP e NR no 4º ($7g \pm 0,6g$ e $7,8g \pm 0,7g$), 10º ($12,4 \pm 1,8g$ e $15,4 \pm 1,7g$), 15º ($17,6 \pm 3,1g$ e $23,0 \pm 2,6g$), 20º ($23 \pm 3,8g$ e $31,1 \pm 4,3g$), 21º ($26,5 \pm 4,9g$ e $34,7 \pm 4,1g$) e 25º ($36,5 \pm 5,7g$ e $44,4 \pm 5,2g$) dia de vida pós-natal. **CONCLUSÃO:** Foram observados retardo ou precocidade em diversos parâmetros, tanto do desenvolvimento físico quanto dos reflexos neuromotores, nos animais NR em relação ao grupo NP. Se tais alterações refletem futuros problemas na vida adulta, considera-se objeto de outros estudos em andamento.

Suporte Financeiro: Rede Mineira de Bioterismo - FAPEMIG (CVZ RED 00009/14). Rede TOXIFAR - FAPEMIG (CBB RED 00008/14).

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

INTRODUÇÃO: A obesidade/sobrepeso tem aumentado significativamente em todo o mundo. Distúrbios cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de cânceres são doenças associadas a essa condição, tendo impacto na qualidade de vida e longevidade da população. Existem evidências de que a origem de alguns distúrbios metabólicos, como a obesidade, que se manifestam na vida adulta, podem ter suas raízes em fases críticas do desenvolvimento como a lactação.

Durante esse período a superalimentação também pode interferir no desenvolvimento físico e neuromotor da prole. Em modelos experimentais o método de redução de ninhada pode induzir a superalimentação durante a lactação. **OBJETIVO:** Avaliar o desenvolvimento físico e neuromotor de filhotes Wistar fêmeas provenientes de ninhada reduzida que foram superalimentadas durante a fase de lactação. **MÉTODOS:** CEUA/UFJF: 045/2015. 72 filhotes Wistar fêmeas providas do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF (CIAEP 0100482013) foram utilizadas no estudo e divididos em dois grupos: ninhada padrão (NP), composta por 10 animais/ninhada e ninhada reduzida (NR) por 4 animais/ninhada. Os animais foram acompanhados para a avaliação do desenvolvimento físico e neuromotor a partir do segundo dia de vida e pesados nos dias 4, 10, 15, 20, 21 e 25. O remanejamento dos filhotes para a formação dos grupos foi realizado no segundo dia pós nascimento. O desmame ocorreu no 21º dia de vida. O desenvolvimento físico dos animais foi avaliado através da observação da abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos e abertura vaginal. Os testes de preensão palmar, orientação, esquiva ao abismo e geotaxia negativa foram realizados para avaliação do desenvolvimento neuromotor. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação das variáveis quantitativas, enquanto que as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Qui Quadrado. O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Os dados são apresentados na sequência NP (n=36) e NR (n=36). Quanto ao desenvolvimento físico, foram observadas diferenças significativas no descolamento de orelhas ($4,58 \pm 0,6$ e $4,69 \pm 0,66$), aparecimento de incisivos tanto superior ($9,75 \pm 0,80$ e $9,55 \pm 0,73$), quanto inferior ($11,52 \pm 0,90$ e $11,30 \pm 0,95$), além de aparecimento de pelos ($5,72 \pm 0,56$ e $5,69 \pm 0,46$) e abertura vaginal ($35,30 \pm 4,35$ e $36,41 \pm 4,56$). Também houve diferenças significativas em alguns reflexos neuromotores, tais como resposta postural ($2,13 \pm 0,35$ e $2,08 \pm 0,36$), esquiva ao abismo ($6,25 \pm 1,87$ e $7,38 \pm 1,60$), geotaxia negativa ($8,16 \pm 1,61$ e $9,22 \pm 1,58$) e orientação ($8,30 \pm 1,56$ e $8,19 \pm 1,72$). A massa corporal desses animais também demonstrou diferenças significativas no 10º ($12,7g \pm 1,4g$ e $14,2g \pm 2,1g$), 15º ($18,9g \pm 2,3g$ e $21,3g \pm 2,2g$), 20º ($25,4g \pm 3,4g$ e $29,5g \pm 3,8g$), 21º ($29,0g \pm 3,8g$ e $32,5g \pm 3,4g$) e 25º ($37,3g \pm 5,4g$ e $40,8g \pm 4,6g$), dias de vida pós-natal. **CONCLUSÃO:** Com a análise do desenvolvimento físico e neuromotor pode-se observar tanto uma precocidade, quanto retardamento em alguns dos parâmetros mensurados. Estudos em andamento buscarão responder se essas alterações acarretarão possíveis consequências na vida adulta desses indivíduos.

Suporte Financeiro: Rede Mineira de Bioterismo - FAPEMIG (CVZ RED 00009/14). Rede TOXIFAR - FAPEMIG (CBB RED 00008/14).

APLICABILIDADE DO TESTE DE VO₂ MÁX. PARA AJUSTE DE CARGAS DE TREINAMENTO PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO.

Tamiris Schaeffer Fontoura, Carlos Gabriel de Lade, Mariana Bolotari, Vinicius Moreira Gonçalves Costa, Ana Eliza Andreazzi, Vera Maria Peters, Martha de Oliveira Guerra.

INTRODUÇÃO - O treinamento físico em esteira é amplamente utilizado em animais de laboratório seguindo protocolos de treinamentos como, por

exemplo, treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) e treinamento em *endurance*, tentando se aproximar ao máximo de modelos realizados em humanos. Entretanto, é necessário realizar ajustes nas cargas de treinamento, visto que cargas sub ou superestimadas, podem produzir resultados não confiáveis e estresse aos animais. A prescrição de cargas de treinamento através da porcentagem da capacidade aeróbica máxima (VO_2 máx.) torna-se importante nesta estratégia.

OBJETIVO - O estudo tem como objetivo avaliar a aplicabilidade e a eficiência de testes de VO_2 máx. para ratos Wistar, visando individualizar cargas de treinamento, o que não é comumente realizado na maioria dos protocolos.

MÉTODOS - Machos e fêmeas foram divididos em 3 grupos: Sedentário (Sed/n=10), *endurance* (End/n=10) e HIIT (HIIT/n=10). O treinamento em *endurance* foi realizado com intensidade moderada (65-70% VO_2 máx.), enquanto o HIIT foi realizado em alta intensidade (85-90% VO_2 máx.) intercalados com períodos de baixa intensidade (50% VO_2 máx.). Todos os animais (sedentários e treinados) foram submetidos ao teste de VO_2 máx. em esteira metabólica com analisador de gases antes, durante e após a realização dos treinos.

RESULTADOS - Ao final do treinamento, os grupos Sed apresentaram menor VO_2 máx. tanto em machos ($19,52 \pm 4,09$), quanto em fêmeas ($20,21 \pm 0,83$) quando comparados com os respectivos grupos treinados: End machos ($34,29 \pm 2,9$), End fêmeas ($36,25 \pm 5,30$) e HIIT machos ($32,73 \pm 5,53$), HIIT fêmeas ($31,63 \pm 3,27$).

CONCLUSÕES - A aplicabilidade dos testes de VO_2 máx. mostrou-se eficaz para o ajuste da carga de treinamento e, conseqüentemente, no aumento da capacidade aeróbica máxima dos animais dos grupos treinados.

CEUA: CEUA/UFJF 045/2015. **Suporte Financeiro:** Toxifar e Rede Mineira de Bioterismo.

DIFERENÇAS BIOQUÍMICAS EM DOIS MODELOS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE POR MODIFICAÇÃO DO PADRÃO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR

Oshio LT¹, Bolotari M¹, Lopes JF¹, Costa VMG¹, Lade CG¹, Sá JP¹, Andreazzi AE¹, Guerra MO¹, Peters VM¹

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

Introdução: são diversos os métodos de indução da obesidade e desordens metabólicas em roedores com o intuito de se estudar esta enfermidade e suas comorbidades. Dentre estes, podem ser citados o método de redução de ninhada (RN) e o do fornecimento de rações hipercalóricas (RH), pois seus resultados são os que mais se assemelham aos encontrados em humanos.

Objetivos: verificar se existem diferenças bioquímicas em ratos Wistar submetidos a métodos diferentes de indução de obesidade. **Métodos:** o método RN consistiu em reduzir o número de crias a 4 crias/mãe (grupo reduzido – GR) em relação ao grupo controle (GC), de 10 crias/mãe. O método RH utilizou a exposição à dieta hipercalórica (DH) desde o desmame, comparada com dieta padrão (DP). Avaliaram-se o peso corporal, testes oral de tolerância à glicose (TOTG), e de tolerância à insulina (TTI), colesterol total (COL) e frações

HDL e LDL, triglicérides (TRIG) e peso relativo das gorduras perigonadal (PERI) e retroperitoneal (RETRO). **Resultados:** o GR apresentou maior peso corporal ($303,25 \pm 26,75\text{g}$) em relação ao GC ($272,7 \pm 22,27\text{g}$). DP x DH apresentaram médias de pesos semelhantes. Em ambos os métodos, houve aumento da adiposidade perigonadal (PERI) e retroperitoneal (RETRO). No protocolo RN, houve alterações nas médias das constantes do TTI (GC: $2,26 \pm 0,85$ e GR: $1,37 \pm 0,65$) e no TOTG (GC: 15.080 ± 1.419 ; GR: 16.815 ± 2.572), o que não ocorreu no método RH. No protocolo RH, houve alteração dos níveis de COL, HDL e LDL, além dos níveis de TRIG: (COL –DP: $64,9 \pm 7,6$ e DH: $76,2 \pm 7,7\text{mg/dL}$); (HDL –DP: $58,4 \pm 6,0$ e DH: $67,5 \pm 7,4\text{mg/dL}$); (LDL –DP: $12,8 \pm 2,4$ e DH: $16,6 \pm 2,9\text{mg/dL}$) e (TRIG – DP: $32,2 \pm 9,4$ e DH: $44,6 \pm 19,0\text{mg/dL}$), o que não aconteceu no método NR. **Conclusões:** Ocorrem diferenças bioquímicas e no peso corporal de ratos Wistar, conforme o método usado para a indução da obesidade.

Apoio Financeiro: Redes Mineiras de Bioterismo e Toxicologia - TOXIFAR - FAPEMIG.

APÊNDICE D – Comparação do consumo máximo de oxigênio intra e intergrupos de machos e fêmeas NCSed, NRSed, NREnd e NRHIIT em três momentos.

Comparação do consumo máximo de oxigênio intra e intergrupos de machos e fêmeas NCSed, NRSed, NREnd e NRHIIT em três momentos.

	Machos		
	VO₂ máx. (1)	VO₂ máx. (2)	VO₂ máx. (3)
NCSed	26,89±3,12	26,23±2,35	21,34±4,29 [¥]
NRSed	28,05±3,60	23,35±2,94	19,63±4,94 [£]
NREnd	24,57±2,28	31,11±4,60	31,74±6,34 ^{*a}
NRHIIT	25,79±3,78	31,83±4,10	30,38±4,99 ^{#b}
	Fêmeas		
	VO₂ máx. (1)	VO₂ máx. (2)	VO₂ máx. (3)
NCSed	24,43±4,33	25,34±3,77	20,21±0,83 [¥]
NRSed	27,61±2,09	24,03±4,20	22,17±3,60 [£]
NREnd	25,30±1,67	32,03±5,23	32,00±3,90 ^{*a}
NRHIIT	25,43±3,86	31,48±3,60	30,21±4,84 ^{#b}

Dados expressos em média ± desvio padrão (ml.Kg.min.). $p < 0,05$; $n = 10$ animais/grupo. [¥]Diferença significativa entre VO₂-1 e VO₂-3 intragrupo (NCSed); [£]Diferença significativa entre VO₂-1 e VO₂-3 intragrupo (NRSed); ^{*}Diferença significativa entre VO₂-1 e VO₂-3 intragrupo (NREnd); [#]Diferença significativa entre VO₂-1 e VO₂-3 intragrupo (NRHIIT); ^aDiferença significativa no VO₂-3 intergrupo (NREnd – NRSed); ^bDiferença significativa no VO₂-3 intergrupo (NRHIIT – NRSed).

**ANEXO A - Certificado de aprovação para realização do estudo pela
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF)**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 045/2015 – CEUA sobre “EFEITOS DE DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO NO METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REPRODUTIVO DE RATOS SUPERALIMENTADOS NA INFÂNCIA” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA com a colaboração de CARLOS GABRIEL DE LADE, VERA MARIA PETERS, ANA ELIZA ANDREAZZI, VINICIUS MOREIRA GONÇALVES COSTA e MARIANA BOLOTARI 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 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 110 ratos Wistar (40 machos e 70 fêmeas) de 2 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/08/2016 a 30/03/2020.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 045/2015 - CEUA about “EFEITOS DE DIFERENTES TIPOS DE TREINAMENTO FÍSICO NO METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REPRODUTIVO DE RATOS SUPERALIMENTADOS NA INFÂNCIA” under responsibility of MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA and collaboration of CARLOS GABRIEL DE LADE, VERA MARIA PETERS, ANA ELIZA ANDREAZZI, VINICIUS MOREIRA GONÇALVES COSTA and MARIANA BOLOTARI - 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 12/07/2016. For the development of this research 110 Wistar rats (40 males and 70 females) of 2 days old, will be delivered as requested in the period of 01/08/2016 to 30/03/2020.

Juiz de Fora, 29 de julho de 2016



 Coordenadora
 CEUA



 Vice-coordenadora
 CEUA