

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO GESTACIONAL NA
SAÚDE MATERNA, FUNÇÃO PLACENTÁRIA E NUTRIÇÃO FETAL**

RECIFE

2022

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO GESTACIONAL NA
SAÚDE MATERNA, FUNÇÃO PLACENTÁRIA E NUTRIÇÃO FETAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor(a) em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Raquel da Silva Aragão

Coorientador: Prof. Dr. José Antônio dos Santos

RECIFE

2022

Catalogação na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

O48e Oliveira, Thaynan Raquel dos Prazeres.
Estudo da influência do treinamento resistido gestacional na saúde materna, função placentária e nutrição fetal / Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira. – 2022. 107 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Raquel da Silva Aragão.
Coorientador : José Antônio dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Treinamento de Força. 2. Placenta. 3. Performance Reprodutiva. 4. Desenvolvimento Fetal. 5. Transporte de Nutrientes. I. Aragão, Raquel da Silva (Orientadora). II. Santos, José Antônio dos (Coorientador). VI. Título.

613.28

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2022-302)

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO RESISTIDO GESTACIONAL NA
SAÚDE MATERNA, FUNÇÃO PLACENTÁRIA E NUTRIÇÃO FETAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutora em Nutrição. Área de concentração:
Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em: 03/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Pinheiro Fernandes (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Gisélia de Santana Muniz (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Jéssica Priscila Fragoso de Moura (Examinador Externo)

Secretaria de Educação do Estado de São Paulo

Prof. Dra. Letícia Martins Ignácio-Souza (Examinador Externo)

Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho a os meus queridos familiares e amigos, que me apoiaram e incentivaram durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e nossa Senhora por me dar forças durante essa jornada e por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida que me possibilitou conduzir este trabalho com amor, ética e sanidade. Obrigada Senhor!

Agradeço a toda minha família, em especial a minha mãe, Sileide Maria pelo amor, apoio incondicional, força e incentivo, minha irmã Thayana e as minhas queridas sobrinhas Maysah e Lyviah, que em diversos momentos difíceis nessa caminhada, me fizeram sorrir e tornaram essa caminhada mais leve e ao meu companheiro, Eric Moraes por estar sempre junto comigo em mais um desafio, agora com o reforço do nosso cachorro bob. Eu amo vocês!

À minha orientadora Professora Raquel Aragão, pela dedicação e por todos os ensinamentos que contribuíram na minha formação acadêmica. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava que seria capaz. Você foi e é uma referência de professora e pesquisadora para mim. Obrigada por tudo!

Ao meu professor co-orientador José Antônio, que tenho profunda admiração e gratidão por todos os ensinamentos e por ter me inserido nesse encantador universo da pesquisa científica.

A Prof^a. Gisélia Santana, que possibilitou infraestrutura para realização do treinamento resistido, em meio a indicação de mudar completamente este estudo por falta de apoio de outros setores. Muita obrigada!

A equipe dessa pesquisa, em especial, a minha amiga, Débora Oliveira, pelo seu amor, compromisso e responsabilidade durante os experimentos e aos meus estagiários, Maira Beatriz, Álvaro Nascimento e Rafael. Concluir este trabalho não seria possível sem estar trabalhando ao lado de vocês! Gratidão!

As minhas companheiras do grupo hiperlipídicas, Jaqueline Silva, Carolina Cadete e Erika Burbano, pela ajuda, ainda que não estivessem envolvidas diretamente relacionadas a este trabalho e pelos momentos de alegria compartilhados.

A colaboração com o laboratório de Patologia animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco coordenado pelo Professo Amaro Júnior, em especial aos amigos que conquistei nessa jornada, Alluanan Silva e Fernanda Dias.

A Unidade de Pesquisa em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, aos professores e a secretária do Programa de Pós-graduação em Nutrição e ao Departamento de Nutrição, em especial, ao veterinário Sr. França e ao funcionário Douglas pela ajuda.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes intensidades de treinamento resistido durante a gestação sobre os parâmetros maternos, placentários e fetais. Foram utilizadas 35 ratas Wistar (60-70 dias de idade) divididas aleatoriamente em cinco grupos: Controle (C, n = 7); Teste máximo (TM, n = 6); Treinamento de intensidade constante (TIC n = 8), Treinamento de intensidade decrescente (TID = 7), Treinamento de intensidade mista (TIM, n = 7). Antes da gestação, as ratas treinadas foram submetidas a um protocolo de treinamento resistido (TR) em escada vertical, 5 sessões/semana, 8-9 subidas por sessão, 80% da capacidade de carregamento máximo (CCM). A intensidade do programa de treinamento resistido antes e durante a gestação foi ajustada semanalmente pelo teste de capacidade de carregamento máximo (TCM). No grupo TM, somente os TCM foram realizados. Após a confirmação da gestação, a intensidade do TR foi ajustada pelo % CCM: Grupo TIC, 80%, 80% e 80%; Grupo TID: 80%, 80% e 50% e grupo TIM: 50%, 80% e 50%, para primeira, segunda e terceira semanas de gestação respectivamente. No 20º dia de gestação, todas as ratas foram sacrificadas. O treinamento resistido não alterou o peso corporal, consumo alimentar ou glicogênio muscular materno. Redução da intensidade do TR na primeira e terceira semana de gestação, TIM, reduziu o percentual de sinciotrofoblasto e aumentou os capilares fetais e essas repercussões foram acompanhadas do aumento da expressão de mRNA de *Glut1*. O grupo com redução da intensidade do TR somente na última semana de gestação, TID, apresentou redução do crescimento fetal com maior impacto sobre os fetos fêmeas, sem alterar os parâmetros metabólicos materno, a composição celular da placenta ou a expressão de genes envolvidos no crescimento placentário e transferência de nutrientes. Enquanto o grupo que manteve a intensidade na gestação, TIC, reduziu a glicose sérica das mães e aumentou a expressão de mRNA de *Glut1* na placenta. A realização apenas dos testes de carregamento máximo, TM, reduziu a albumina sérica e o tamanho do adipócito materno e aumentou número de fêmeas na ninhada. Essas alterações foram acompanhadas por redução do percentual de sinciotrofoblasto e aumento de capilares fetais e da expressão de mRNA de *Snat1* na placenta. Nossos resultados demonstram que manter a intensidade do TR igual ao período pré-gestacional parece ser mais seguro para mãe e para o crescimento feto-placentário, enquanto realizar apenas teste máximos ou alterar a intensidade do treinamento durante a gestação afeta o crescimento feto-placentário.

Palavras-chave: treinamento de força; placenta; performance reprodutiva; desenvolvimento fetal; transporte de nutrientes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of different intensities of resistance training (RT) during pregnancy on maternal, placental, and fetal parameters. Thirty-five Wistar female rats (60-70 days old) were randomly divided into five groups: Control (C, n = 7); Maximum load test (ML, n = 6); Constant Intensity Training (CIT n = 8), Decreasing Intensity Training (DIT = 7), Variable Intensity Training (VIT n = 7). Before pregnancy, the trained groups were submitted to a resistance training protocol (RT) in the vertical ladder climb, 5 day/week, 8-9 climbs/session with 80% of the maximum carrying capacity (MCC). The intensity of the resistance training program before and during pregnancy was weekly adjusted by the maximum load test (MLT). In the ML group, only MLTs were performed. After the pregnancy was confirmed, the RT intensity was adjusted by % MCC: Group CIT, 80%, 80% and 80%; DIT Group: 80%, 80% and 50% and VIT Group: 50%, 80% and 50%, for the first, second and third weeks of pregnancy respectively. On the 20th day of pregnancy all female rats were sacrificed. RT did not change dams' body weight, food consumption or muscle glycogen. Reduction in RT intensity in the first and third weeks of pregnancy, VIT, reduced the percentage of syncytiotrophoblast and increased fetal capillaries, and it was accompanied by increased *Glut1* mRNA expression. The group with reduction in RT intensity only in the last week of pregnancy, presented reduced fetal growth, with greater impact on female fetuses, without changes in maternal metabolic parameters, placental cellular composition or expression of genes involved in placental growth and nutrient transfer. While the group that maintained the intensity during pregnancy, TIC, reduced maternal serum glucose and increased placental expression of *Glut1* mRNA. The groups that made only the MLT, reduced maternal serum albumin and adipocyte size and increased number of females in litter. These changes were accompanied by reduced percentage of syncytiotrophoblast and increased fetal capillaries, and expression of *Snat1* mRNA in placenta. The groups that did only the maximum load test, ML, reduced serum albumin and maternal adipocyte size and increased the number of females in the litter. These changes were accompanied by a reduction in the percentage of syncytiotrophoblast and an increase in fetal capillaries and *Snat1* mRNA expression in the placenta. Our results show that maintain gestational RT intensity equal to pre-gestational period seems to be safer for mothers and to fetus-placental growth, while performing the MLT or changing the RT intensity during pregnancy affects the fetus-placental growth.

Keywords: strength training; placenta; reproductive performance; fetal development; nutrient transport.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
C	Grupo Controle
CCM	Capacidade de Carregamento Máximo
CG	Células de glicogênio
CGM	Células granulosas metriais
c-MET	<i>Tyrosine-protein kinase Met</i>
CTG	Células Trofoblásticas Gigantes
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPC	Cone ectoplacentário
FABP	<i>Fatty acid-binding protein</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FGFR-2	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
Gcm1	<i>Glial Cells Missing Transcription Factor 1</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
h-FABP	<i>Heart-type fatty acid binding protein</i>
IFNγ	<i>Interferon-gamma</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor1 receptor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
LP	Hormônio Lactogênio Placentário

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NGF	<i>Nerve growth fator</i>
NKu	<i>Uterine natural killer cells</i>
NT	Grupo Não-Treinada
NTF-4	<i>Neurotrophin 4</i>
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
SNAT	<i>Sodium-coupled neutral amino acid transporter</i>
TCM	Teste de Capacidade de carregamento máximo
TIC	Grupo Treinada Intensidade Constante
TID	Grupo Treinada Intensidade Decrescente
TIM	Grupo Treinada Intensidade Mista
TR	Treinamento Resistido
TrKb	<i>Tyrosine receptor Kinase B</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i>
VO₂máx	Consumo máximo de oxigênio
ZDP	Zona Decidual Primária
ZDS	Zona Decidual Secundária
ZJ	Zona juncional
ZL	Zona do labirinto
11β-HSD2	<i>11-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO	15
2.1.1	Da fecundação à implantação	15
2.1.2	Decidualização e migração do trofoblasto	17
2.1.3	Zona Juncional e Zona labiríntica	19
2.1.4	Crescimento da placenta	23
2.2	NUTRIÇÃO E PLACENTA	24
2.2.1	Sistema de Transporte de Nutrientes na Placenta	24
2.2.2	Transporte de glicose na Placenta	25
2.2.3	Transporte de aminoácidos na Placenta	26
2.2.4	Transporte de lipídios na Placenta	26
2.2.5	Regulação do transporte de Nutrientes na Placenta	27
2.3	PLACENTA E EXERCÍCIO NA PERSPECTIVA DA DOHAD	28
3	HIPÓTESE	36
4	OBJETIVO.....	37
4.1	GERAL	37
4.2	ESPECÍFICOS.....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	QUESTÕES ÉTICAS	38
5.2	ANIMAIS	38
5.3	PROTOCOLO DE TREINAMENTO RESISTIDO PRÉ-GESTACIONAL E GESTACIONAL	39
5.4	AVALIAÇÃO DAS MÃES.....	41
5.4.1	Avaliação do desempenho das ratas no TCM e treinamento resistido.....	41

5.4.2	Avaliação do peso corporal.....	42
5.4.3	Consumo alimentar.....	42
5.4.4	Coleta de amostras.....	42
5.4.5	Avaliação da Performance reprodutiva.....	43
5.4.6	Análises do perfil bioquímico do soro	43
5.4.7	Análise histomorfométrica do glicogênio muscular.....	43
5.4.8	Análise morfométrica do tecido adiposo.....	44
5.5	AVALIAÇÃO DA PLACENTA.....	44
5.5.1	Análise Morfométrica da placenta	44
5.5.2	Análise da expressão de genes na placenta	46
5.6	AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA NOS FETOS.....	47
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
6	RESULTADOS	48
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL 1.....	62
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL 2.....	87
	APÊNDICE C – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO..	104
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	107

1 INTRODUÇÃO

Nos períodos iniciais da vida, como gestação, lactação e anos iniciais da vida, os órgãos e tecidos apresentam uma rápida proliferação e diferenciação celular (BOGIN, 2020). Estes períodos são conceituados como períodos críticos de desenvolvimento (CAMERON e DEMERATH, 2002), em que insultos ambientais como nutrição, atividade física e estresse, atuando durante esses momentos podem gerar respostas adaptativas alterando o desenvolvimento do organismo que repercutem em alterações morfológicas, fisiológicas e/ou comportamentais (GLUCKMAN, HANSON e SPENCER, 2005). Esse fenômeno biológico é chamado de plasticidade fenotípica, onde um único genótipo dar origem a diversos fenótipos em resposta a diferentes condições ambientais (WEST-EBERHARD, 2005). Assim, a plasticidade no período crítico permite que o organismo modifique sua trajetória de crescimento e desenvolvimento através de processos adaptativos, podendo ser alterado sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (WEST-EBERHARD, 2005).

Um estímulo que tem recebido bastante interesse, como possível modulador adaptações fisiológicas e regular o crescimento feto-placentário é o treinamento físico (CLAPP, 2006). O treinamento físico é descrito como a prática regular de exercício físico (CASPERSEN, POWELL e CHRISTENSON, 1985). O exercício físico é referido como uma forma de atividade física, ou seja, qualquer movimento corporal que demande um gasto energético acima do valor basal (CASPERSEN, POWELL e CHRISTENSON, 1985), realizado de forma sistemática levando em consideração a intensidade, frequência e o tipo de exercício (CASPERSEN, POWELL e CHRISTENSON, 1985). Dentre os tipos de exercício, queremos destacar o exercício físico resistido que é caracterizado pela aplicação de uma sobrecarga progressiva sobre o corpo (KRAEMER e RATAMESS, 2004). Os ajustes de intensidade no exercício resistido podem ser realizados pela alteração na velocidade de execução, nos intervalos entre as séries e sessões por semana e na sobrecarga utilizada (KRAEMER e RATAMESS, 2004). As características treináveis do exercício resistido incluem força, potência, hipertrofia e resistência muscular (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, 2009).

Durante o período gestacional, diferentes tipos de exercício aeróbio e resistido são recomendados para gestantes sem complicações ou contraindicações obstétricas (ACOG, 2020; SBC, 2021). De acordo com o American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG) gestantes saudáveis sem complicações, devem ser encorajadas a prática de exercício físico aeróbico e resistido, 20-30 minutos por dia, com intensidade moderada visando melhorar ou manter a capacidade física, redução do ganho de peso e risco de diabetes gestacional e aumento

do bem estar psicológico (ACOG, 2020). No entanto, a indicação da intensidade do treinamento resistido tende a ser cautelosa devido a possibilidade de desaceleração da frequência cardíaca fetal resultante da manobra de valsava (ACOG, 2020) e pela escassez de estudos avaliando as repercussões do treinamento resistido em diferentes intensidades na gestação.

Em humanos, o exercício aeróbio (55-60% $VO_{2máx}$) de intensidade moderada no início da gravidez melhorou a capacidade funcional placentária com aumento do crescimento fetal (CLAPP *et al.*, 2000a), enquanto o alto volume de exercícios na mesma intensidade no segundo e terceiro trimestre gestacional, reduziu o crescimento feto-placentário (CLAPP *et al.*, 2002). Em ratas, o treinamento de força em escada durante a gestação (3 vezes por semana/35-75% da carga máxima), não alterou o desenvolvimento físico da prole de machos, mas promoveu mudanças transitórias no peso corporal e eixo anteroposterior e látero-lateral (MEIRELES *et al.*, 2021d). Em outro estudo com ratas, o programa de exercício em esteira durante a gestação (5 dias por semana/ 50min-20min/dia), promoveu alterações na expressão gênica de IGF-1 na placenta (MANGWIRO *et al.*, 2018) e a associação desse programa de exercício ao consumo de dieta hiperlipídica, alterou a expressão de transportadores do sistema A de transporte de aminoácidos na placenta (MANGWIRO *et al.*, 2019).

Alterações no crescimento feto-placentário podem ocorrer por modificações na entrega de nutrientes que está relacionada com o fluxo de sangue no leito placentário e da concentração de nutrientes no sangue arterial materno e por alterações nas vias de sinalização para o crescimento feto-placentário (FRIAS *et al.*, 2011; KWON e KIM, 2017b; WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). O exercício físico agudo ou crônico pode reduzir o fluxo de sangue na placenta pelo desvio do fluxo sanguíneo das vísceras para o músculo e pele (SALTIN e ROWELL, 1980) e a magnitude da redução do fluxo sanguíneo placentário está diretamente relacionada com a intensidade, duração e tipo do exercício, e do condicionamento físico materno (CLAPP, 2003).

No presente estudo, diversos mecanismos moleculares, como a alteração da expressão gênica de fatores de crescimento e de genes relacionados a regulação do transporte de nutrientes na placenta; e mecanismos morfológicos, como a alteração do número e tamanho das células placentárias e de outros tecidos como músculo esquelético e tecido adiposo, são propostos como resposta adaptativa ao treinamento resistido materno com consequente repercussão sobre o crescimento feto-placentário dependente da intensidade do treinamento em diferentes períodos da gestação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO

2.1.1 Da fecundação à implantação

A fecundação representa a culminância dos trajetos realizados pelo espermatozoide e o oócito no trato reprodutor feminino (CARLSON, 2019). Para a penetração do espermatozoide no oócito, os espermatozoides necessitam atravessar barreiras físicas. Na primeira barreira do oócito, a corona radiata, o espermatozoide libera uma enzima chamada hialuronidase que quebra as conexões moleculares entre as células da corona radiata e assim permite sua passagem (CARLSON, 2019). Em seguida, para penetrar a zona pelúcida, a segunda barreira, dois eventos importantes são necessários: o primeiro corresponde à interação de proteínas de ligação específicas, localizados na cabeça do espermatozoide e o componente glicoproteico (ZP-3) da zona pelúcida; o segundo evento é a consequência da reação acrossômica na célula espermática que resulta na liberação de enzimas permitindo a abertura da zona pelúcida e consequente chegada do espermatozoide à membrana plasmática do oócito (HARDY, 2010). A última etapa do processo de transporte de espermatozoide é a fusão entre a membrana plasmática do oócito com a do espermatozoide. Alguns segundos após a fusão, a membrana plasmática do oócito sofre uma despolarização, que impede que outros espermatozoides o fecundem, a polispermia (HARDY, 2010). Após a penetração do espermatozoide no oócito, os cromossomos do espermatozoide se combinam com os do oócito, resultando na fusão dos pronúcleos haploides (n), feminino e masculino em um núcleo diploide (2n) único que reestabelece o número diploide de 46 cromossomos e assim surge um indivíduo geneticamente novo, o zigoto, o oócito fertilizado (HARDY, 2010).

Em geral, todo processo de fecundação ocorre na tuba uterina auxiliado pelas contrações peristálticas da musculatura lisa tubária e pelos batimentos dos cílios da superfície epitelial (HARDY, 2010). O oócito fertilizado (Zigoto) será transportado para o local de implantação no útero onde continuará o desenvolvimento embrionário. Durante seu trajeto, o embrião permanece confinado à zona pelúcida circundante e ocorre a clivagem, que corresponde a diversas divisões celulares mitóticas no zigoto (HARDY, 2010). As células progressivamente menores produzidas pela clivagem são chamadas de blastômeros, que após sucessivas divisões, produzem uma esfera sólida de células chamada mórula. Enquanto a mórula se move ao longo da tuba uterina até a cavidade uterina, o número de células aumenta (HARDY, 2010). Ao alcançar a cavidade uterina, a mórula em desenvolvimento é nutrida pelas secreções liberadas

pelas glândulas endometriais e pelos nutrientes armazenados nos blastômeros. O fluido da cavidade uterina entra na mórula pela zona pelúcida e forma uma cavidade chamada de blastocele (CARLSON, 2019).

À medida que o fluido aumenta na cavidade, os blastômeros se reorganizam e são separados em duas populações distintas de célula: a Massa Celular Interna (MCI), o embrioblasto, que corresponde ao um grupo de blastômeros localizados centralmente que dará origem as células percussoras do embrião, epiblasto e hipoblasto, ao âmnio, ao saco vitelino e ao alantoide; e o trofotoderma, camada celular externa que formará as células trofoblásticas da porção embrionária da placenta (CARLSON, 2019) (Fig.1). Em roedores, o trofotoderma pode ser dividido em duas regiões definidas pela posição em relação a massa celular interna, o trofotoderma mural e o trofotoderma polar (RENAUD, 2017). O trofotoderma mural circunda a cavidade do blastocisto, enquanto o trofotoderma polar dá origem ao ectoderma extraembrionário e cone ectoplacentário (RENAUD, 2017). Em humanos, diferentemente dos roedores, o trofotoderma adjacente a massa celular interna não se organiza em uma estrutura cilíndrica, mas continua a proliferar como células citotrofoblásticas que se diferenciam mais tarde em sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto (RENAUD, 2017).

Ainda no estágio de blastocisto, o embrião agora na cavidade uterina inicia a eclosão, denominada *hatching*, processo no qual ocorre o rompimento da zona pelúcida para estabelecer contato celular entre o trofotoderma e a superfície do epitélio endometrial para iniciar a implantação (CARLSON, 2019). A implantação é um processo de múltiplas etapas no qual o blastocisto se liga intimamente à superfície endometrial para formar a placenta, que fornecerá conexão entre o feto e a circulação materna (SHARKEY e SMITH, 2003). Este processo ocorre de forma sequencial e é classificado em três estágios: aposição, adesão e invasão. Na fase de aposição, após o blastocisto deixar a zona pelúcida, as células do trofoblasto se fixam de forma instável à superfície do epitélio endometrial pela região do polo embrionário, que corresponde a região que está localizado o embrioblasto. Em seguida, na fase de adesão, o blastocisto se adere de firmemente ao epitélio endometrial para iniciar a invasão (SHARKEY e SMITH, 2003). A invasão do blastocisto, a implantação, requer o endométrio receptivo, que é definido pela capacidade da mucosa uterina em facilitar a implantação embrionária bem-sucedida (ARMANT, WANG J FAU - LIU e LIU, 2000). Para isso, as células do estroma endometrial sofrem a decidualização, processo no qual ocorre a diferenciação das células estromais em um tipo especializado de células denominadas células deciduais (YUAN *et al.*, 2019).

2.1.2 Decidualização e migração do trofoblasto

O endométrio decidualizado é essencial na proteção da rejeição imunológica materna, fornecimento do suporte nutricional para o embrião antes da formação da placenta e produção de hormônios, como a prolactina e fatores de crescimento (OKADA, TSUZUKI e MURATA, 2018). O processo de diferenciação das células estromais em células deciduais é regulado principalmente pelas alterações dinâmicas na secreção do estradiol e progesterona pelos ovários (LIANG *et al.*, 2018). As células deciduais apresentam um fenótipo semelhante a células epiteliais, núcleos aumentados e arredondados, grânulos de secreção ligados à membrana, acúmulo citoplasmático de glicogênio e lipídio e a expansão do retículo rugoso e complexo de golgi (TUNG HN FAU - PARR e PARR, 1986; OKADA, TSUZUKI e MURATA, 2018). Além disso, essas células são geneticamente programadas para diminuir a quantidade de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória e assim resistir a invasão tecidual e facilitar a invasão do trofoblasto (NG *et al.*, 2020).

Em roedores, a decidualização ocorre após a invasão do blastocisto e é acompanhada por uma remodelação da vasculatura que circunda a zona de implantação do embrião, enquanto em humanos, a remodelação vascular ocorre em fases cíclicas a cada ciclo menstrual (KENNEDY, 2003; RAMATHAL *et al.*, 2010). O desenvolvimento da decídua inicia-se no polo antimesometrial, no lado oposto à implantação do blastocisto, com a Zona Decidual Primária (ZDP) (TUNG HN FAU - PARR e PARR, 1986). Subsequentemente, a ZDP se degenera gradualmente com o surgimento da Zona Decidual Secundária (ZDS) formada a partir de células deciduais mais frouxas ao redor da zona decidual primária (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Com o crescimento placentário e embrionário, a ZDS é lentamente substituída e se desenvolve a decídua capsular e decídua basal. A decídua capsular, recobre o embrião, enquanto a decídua basal está localizada na base da placenta (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). A decídua restante, consiste no tecido nos lados do útero não ocupado pelo embrião, e é denominada a decídua parietal (DIXON *et al.*, 2018). As células deciduais possuem alta atividade secretora, produzindo prolactina, alfa-2 macroglobulina (α_2M) e fatores de crescimento como Fator de Crescimento transformador beta (TGF- β) (BAZER, WU e JOHNSON, 2018). A prolactina é o principal hormônio da decídua que mantém a secreção da progesterona pelo corpo lúteo, essencial para manutenção da gestação (BAZER, WU e JOHNSON, 2018).

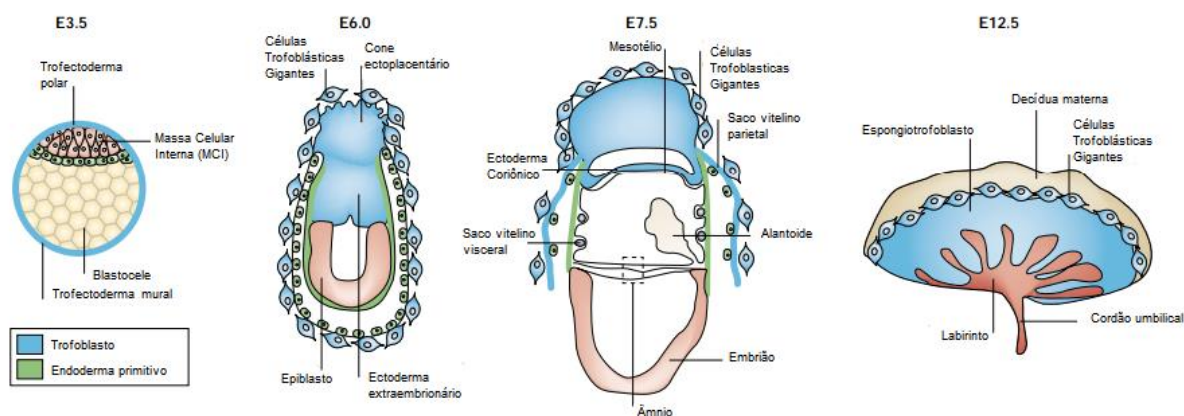
Ainda durante a decidualização, as células Natural Killer Uterina (NKu) são abundantes no endométrio (HERINGTON e BANY, 2007b). As células NKu são o principal componente

das células granulosas metriais (CGM), também denominada glândula metrial (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). As CGMs ocupam o espaço na parede uterina entre as camadas do musculo liso, miométrio no início da gestação e corresponde a um tecido específico de roedores. As Células NKu se infiltram no endométrio a partir do 6º dia de gestação para coordenar o remodelamento vascular na interface materno-fetal (WANG *et al.*, 2000). As artérias espirais uterinas são cercadas por células NKu que destroem sua membrana basal e produzem o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento placentário (PGF) (TAYADE *et al.*, 2007). Esses fatores, estão envolvidos nos estágios iniciais do remodelamento vascular (LASH *et al.*, 2006). Evidências apontam que na medida que a decidualização prossegue, as células NKu são ativadas, se desenvolvem em células NKu maduras granuladas e tornam-se a principal fonte de interferon gama (IFN γ) (HERINGTON e BANY, 2007a). O IFN γ por sua vez, desempenha papel fundamental nas modificações da arteríola espiral (ASHKAR, DI SANTO JP FAU - CROY e CROY, 2000).

A migração do trofoblasto na interface materna-fetal é principal processo na implantação e placentação e, portanto, essencial para o sucesso da gestação em mulheres e roedores (SILVA e SERAKIDES, 2016). A implantação na decídua se inicia logo após a formação do blastocisto. Em roedores, com a implantação que ocorre entre o 4º e 5º dia de gestação, as células do trofotoderma se diferenciam em Células Trofoblásticas Gigantes (CTG) (SUTHERLAND, 2003; HU e CROSS, 2010) (Figura. 1). As CTGs são grandes células poliploides e principais células endócrinas da placenta que sintetizam uma variedade de proteínas, moléculas de adesão células, hormônios e citocinas da família da prolactina, que modulam o ambiente uterino, essencial para o crescimento fetal (FURUKAWA *et al.*, 2011). As células do trofotoderma mural são as primeiras a se diferenciar e originar as células trofoblásticas gigante, no processo de diferenciação primária das CTGs (CTG-P) (HU e CROSS, 2010). Essas células aumentam a sua adesividade para se fixar ao útero, expressando diversas integrinas como $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e produzem progesterona que contribuem para preparação das células epiteliais uterinas tornando-as capazes de receber o blastocisto promovendo a decidualização das células do estroma endometrial (HU e CROSS, 2010). Após a fixação do blastocisto, as CTGs invadem o epitélio uterino e estabelecem anastomoses com os espaços sanguíneos ao redor do local de implantação contribuindo para formação do saco vitelino parietal, que protege e fornece local para troca de nutrientes e gases da mãe para o feto pós-implantação (HU e CROSS, 2010). Após a implantação, outros subtipos de CTGs surgem da diferenciação secundária das CTGs (CTG-S) no trofotoderma polar, especificamente do

ectoderma extraembrionário e o cone ectoplacentário (EPC) (HU e CROSS, 2010). A borda e o centro do cone ectoplacentário diferenciam-se em zona juncional (ZJ), também conhecida como zona basal (CHAREST *et al.*, 2018), enquanto a membrana do cone ectoplacentário do lado embrionário diferencia-se na zona de labirinto (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019) (Figura.1 e 3A).

Figura 1. Desenvolvimento placentário em roedores.



Início do desenvolvimento do embrião de roedor do dia embrionário (E) 3.5-E12.5 e as origens das linhagens extraembrionárias e os componentes da placenta. Adaptado de (ROSSANT e CROSS, 2001).

2.1.3 Zona juncional e Zona labiríntica

A zona juncional corresponde a principal camada endócrina da placenta, responsável pela secreção do hormônio Lactogênio Placentário (LP) na circulação materna (SIMMONS, 2014) que resulta na indução da liberação de progesterona do corpo lúteo em roedores (INAGAKI *et al.*, 2020). A ZJ está localizada entre a decídua e a zona do labirinto e é composta de CTGs, espongiotrofoblasto e células de glicogênio (CG) (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). As células trofoblásticas gigantes, estão localizadas entre a camada do espongiotrofoblasto e a decídua basal que fornecem a primeira camada superficial para o EPC no 10º dia de gestação (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Os espongiotrofoblastos são derivados das camadas externas do EPC e estão localizados imediatamente acima da camada de células trofoblásticas, fornecendo uma componente estrutural importante na zona juncional (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). As células de glicogênio acumulam

grânulos ricos em glicogênio, que são apontados para ser uma fonte de glicose para suportar o crescimento fetal no final da gestação e/ou fornecer energia diretamente para placenta (TUNSTER *et al.*, 2020). As CGs aparecem transitoriamente na ZJ em torno do 12º dia gestacional e se desenvolvem em ilhas de células de glicogênio que compreendem grande parte da zona juncional entre o 15º e 16º dia gestacional (COAN *et al.*, 2006). Após o 17º dia de gestação, com a regressão da ZJ, as células de glicogênio sofrem picnose e então, quase todas desaparecem no 21º dia de gestação (COAN *et al.*, 2006) (Figura 2).

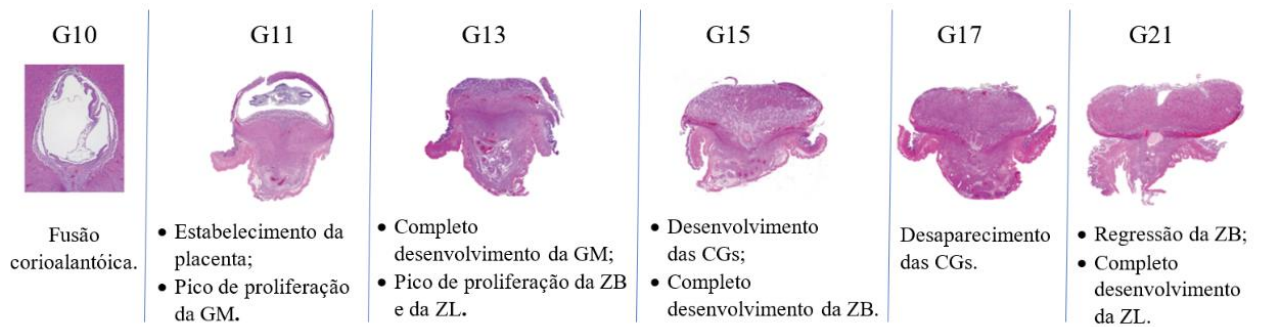
A zona do labirinto (ZL) ocupa maior parte da placenta e consiste na interface para a troca nutrientes, gases e resíduos entre as circulações materna e fetal (TAKATA, FUJIKURA e SHIN, 1997). O desenvolvimento do ZL envolve a interação de três estruturas: o cone ectoplacentário, o córion e o alantoide (SIMMONS, 2014). O córion consiste numa membrana de dupla camada que é derivado principalmente do ectoderma extraembrionário, os trofoblastos coriônicos e suplementadas com células do epiblasto proximal que é derivado do mesoderma extraembrionário, que surge aproximadamente 7 dias após o coito (SIMMONS, 2014; RENAUD, 2017). O alantoide é uma estrutura sacular vascularizada desenvolvido na extremidade posterior do embrião e derivado mesoderma extraembrionário, sendo a sua formação concomitante com a do córion (SIMMONS, 2014). Por volta do 8º dia embrionário, o alantoide cresce em direção ao córion para processo referido como fusão corioalantóica (SIMMONS, 2014) (Figura 2).

Com a fusão corioalantóica no 10º dia embrionário, os vasos sanguíneos fetais que emanam do mesoderma alantoide induzem as células trofoblásticas coriônicas a sofrer extensa morfogênese ramificada produzindo vilosidades em forma de árvore (RENAUD, 2017). O fator de transcrição Gcm1 é essencial para a formação das vilosidades (SIMMONS, 2014). Na ausência de Gcm1, o alantoide se fixa ao córion, mas a morfogênese ramificada não é iniciada (ANSON-CARTWRIGHT *et al.*, 2000). A contínua morfogênese ramificada produz uma estrutura vilosa complexa que fornecem uma extensa área de superfície para troca de nutrientes e gases entre as circulações materna e fetal a partir 10,5º dia embrionário e continua a expandir seu tamanho e complexidade até o 18º dia embrionário (SIMMONS, 2014) (Figura 2). A interface de troca no labirinto em roedores contém três camadas de trofoblastos diferenciados que separam o sangue materno das células endoteliais fetais (Figura 3B). Em roedores, essa organização é a característica da placenta hemotricorial (RENAUD, 2017) (Figura 3B). A camada I é composta por células trofoblásticas mononucleares que residem no espaço sanguíneo materno e são denominadas de citotrofoblastos (FURUKAWA, TSUJI e

SUGIYAMA, 2019) ou células trofoblásticas gigantes sinusoidais (SIMMONS *et al.*, 2008). Adjacente à camada I, estão duas camadas de células sinciciotroblásticas, as camadas II e III (SIMMONS *et al.*, 2008). Na camada I, os citotrofbastos apresentam fenestrações e estão ligadas frouxamente à camada II de sinciciotrofbasto por adesões desmossômicas (COAN, FERGUSON-SMITH AC FAU - BURTON e BURTON, 2005). As fenestrações dos citotrofbastos permitem que as células sinciciais tenham acesso direto ao sangue materno (COAN, FERGUSON-SMITH AC FAU - BURTON e BURTON, 2005). Além disso, os citotrofbastos podem auxiliar na estase sanguínea, diminuindo o fluxo sanguíneo materno para proteger a delicada superfície apical do sinciciotrofbasto e assim facilitar a difusão de nutrientes e gases (RENAUD, 2017; FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). As camadas sinciciais II e III se comunicam por meio da junção comunicante, conexina-26, que possibilita que as duas camadas de sinciciotrofbasto funcionem como uma única camada (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019) (Figura 3 C).

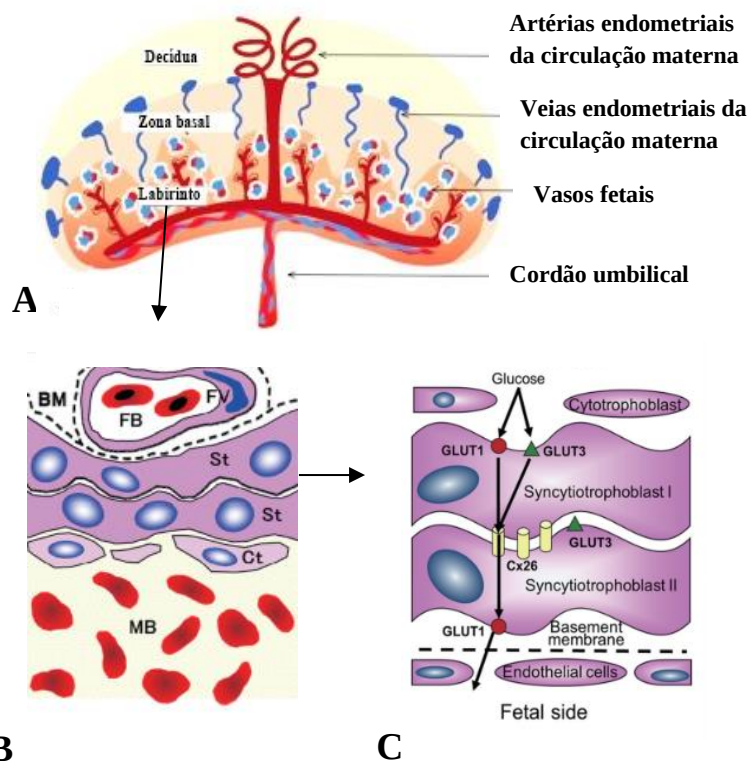
Os sinciciotrofbastos são originados da fusão de citotrofbastos e atuam no estabelecimento da superfície de transporte da placenta entre a mãe o feto (WOODS, PEREZ-GARCIA e HEMBERGER, 2018). Devido a relevância funcional que células sinciciais apresentam no labirinto, qualquer alteração nessas camadas pode modificar a capacidade da placenta em mediar a transferência de nutrientes e oxigênio para feto e assim afetar o crescimento fetal (WOODS, PEREZ-GARCIA e HEMBERGER, 2018). O tamanho do compartimento do labirinto é um importante determinante da capacidade de nutrir o feto (WOODS, PEREZ-GARCIA e HEMBERGER, 2018). Um labirinto pequeno, por exemplo, tem uma área de superfície de transporte reduzida, limitando os nutrientes disponíveis para circulação fetal e, portanto, restringindo a extensão do crescimento fetal (SIBILIA e WAGNER, 1995; WATSON e CROSS, 2005). A redução do labirinto pode ser resultado de falha no labirinto em expandir ou devido ao tamanho reduzido da placenta como um todo (YUNG *et al.*, 2012).

Figura 2. Desenvolvimento morfológico da placenta de ratos.



Eventos histológicos durante o desenvolvimento da placenta. GM, glândula metrial; ZB zona basal; ZL, zona do labirinto e CGs, Células de glicogênio. Adaptado de (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019).

Figura 3. Interface materno-fetal em ratos.



Interface materno-fetal (labirinto-ratos). BM, membrana basal; Ct, citotrofoblasto; FB, sangue fetal; FV, vaso fetal; MB, sangue materno e St, sincitiotrofoblasto. (A) adaptado de (RAI e CROSS, 2014) e (B e C) adaptado de (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019).

2.1.4 Crescimento da placenta

O crescimento do labirinto é regulado por genes que codificam os principais componentes dos fatores de crescimento, incluindo os receptores para fator de crescimento de fibroblastos (FGFR-2), fator inibidor de leucemia (LIFR), Fator crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor tirosina quinase MET (c-MET) (EL-HASHASH, WARBURTON D FAU - KIMBER e KIMBER, 2009). O c-MET, está envolvido na proliferação de células progenitoras do trofoblasto no labirinto e a sua deleção leva a redução do tamanho e celularidade do labirinto e ao desenvolvimento deficiente da estrutura de ramificação vascular (UENO *et al.*, 2013). Camundongos com deleção de FGFR-2 e EGFR, inviabiliza o progresso do desenvolvimento embrionário no meio da gestação, devido à interrupção de desenvolvimento do labirinto e da zona juncional (SIBILIA e WAGNER, 1995).

Outro importante regulador do crescimento e desenvolvimento placentário é o sistema do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) (SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2011). A placenta é a principal fonte de IGF tipo 2 (IGF-2), sendo expresso no espongiotrofoblasto e as células de glicogênio da zona juncional e pela camada de sinciciotrofoblasto do labirinto, enquanto o IGF tipo I, é pouco expresso na placenta (NAYAK e GIUDICE, 2003). O sistema IGF também consiste em receptores específicos para IGF e proteínas de ligação (HAN *et al.*, 1996). Os receptores para IGF tipo 1 (IGF1R) e IGF-2 (IGF2R) se ligam ao IGF-1 e IGF-2 e ativam vias que promovem a proliferação e diferenciação das células trofoblásticas e o crescimento placentário respectivamente (HAN *et al.*, 1996). As proteínas de ligação do IGF (IGFBPs), possuem maior afinidade para o IGF- tipo 1 e 2 do que os receptores de IGF e fornecem um reservatório circulante de armazenamento para IGF, prolongando sua meia vida e influenciando na capacidade do IGF agir em seus receptores (HAN *et al.*, 1996). A deleção de IGF-1 e IGF1R promove a restrição de crescimento fetal, no entanto sem alteração no peso placentário (SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2017). Em camundongo nocaute para IGF-2 e IGF2R, foi observado restrição do crescimento fetal acompanhado de alteração na morfologia da placenta, com redução do volume do labirinto, barreira difusional espessada e consequente diminuição da capacidade de transferência da placenta (CONSTÂNCIA *et al.*, 2005). Além disso, o IGF-2 interage com o sistema de transporte placentário na adaptação da oferta de nutrientes à demanda fetal no camundongo (CONSTANCIA *et al.*, 2002).

Membros da família de neurotrofinas, Fator de Crescimento Neural (NGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e as Neurotrofinas 3 e 4 (NTF-3, NTF-4) desempenham importante papel no desenvolvimento e maturação placentária (SAHAY,

SUNDRANI e JOSHI, 2017). Em roedores, foi demonstrado que o NGF derivado da decídua atua como um fator de crescimento promovendo a diferenciação de células gigantes do trofoblasto (KANAI-AZUMA *et al.*, 1997), além de contribuir na modulação da angiogênese durante a gestação, através da estimulação do VEGF (JULIO-PIEPER *et al.*, 2006). (SAHAY, SUNDRANI e JOSHI, 2017). O BDNF e seu receptor de tropomiosina quinase tipo B (TrkB), são expressos na placenta (GARCÉS *et al.*, 2014) e atuam no crescimento e sobrevivência das células trofoblásticas, sugerindo que pode ser crítico para o desenvolvimento do sistema feto-placentário (SAHAY, SUNDRANI e JOSHI, 2017). Enquanto, a NTF-4 está envolvida na angiogênese (KRAEMER e HEMPSTEAD, 2003) e também ativa o receptor TrkB (FUJITA *et al.*, 2011).

Outro contribuinte para o crescimento placentário é a enzima 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11β -Hsd2)(KONSTANTAKOU *et al.*, 2017). A 11β -HSD2 é expressa durante a gestação, principalmente em sinciciotrofoblastos na placenta e funciona como uma barreira de proteção atuando na inativação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) (KONSTANTAKOU *et al.*, 2017). Em camundongos, a ausência de 11β -Hsd2 promove redução da vascularização placentária e restrição do crescimento peso fetal (WYRWOLL, SECKL e HOLMES, 2009).

2.2 NUTRIÇÃO E PLACENTA

2.2.1 Sistema de transporte na placenta

A zona do labirinto desempenha importante papel na troca de O_2/CO_2 , no fornecimento de nutrientes para o feto e remoção de resíduos (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). São os sinciciotrofoblastos que atuam diretamente na transferência de produtos entre a mãe e o feto através de vários transportadores na membrana plasmática entre o lado materno e fetal (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Os nutrientes são transferidos por vários mecanismos, incluindo a difusão passiva, a difusão facilitada e o transporte ativo (HAYWARD, JONES e SIBLEY, 2008). Em roedores, a camada trilaminar de células trofoblásticas separa o capilar fetal do espaço sanguíneo materno, denominado sinusóides maternos (ADAMSON *et al.*, 2002). Uma bicamada de sinciciotrofoblastos circunda o endotélio do vaso sanguíneo fetal enquanto a outra camada de células mononucleares, os citotrofoblastos, reveste os seios sanguíneos materno (ADAMSON *et al.*, 2002). Devido a essa formação, os nutrientes, os gases e resíduos, devem se difundir ou ser transportados através de quatro camadas para ir de um

compartimento sanguíneo para o próximo (WATSON e CROSS, 2002). A avaliação da capacidade de difusão da placenta, pode ser realizada através da mediação da área de superfície e espessura das camadas de trofoblastos no labirinto e pela quantificação da expressão da fosfatase alcalina, expressa por citotrofoblastos (WU *et al.*, 2003). Além disso, a capacidade de transporte de nutrientes, pode ser avaliada diretamente medindo conteúdo acumulado de nutrientes ou os transportadores de nutrientes (WATSON e CROSS, 2002).

2.2.2 Transporte de Glicose

A glicose é o principal nutriente necessário para o crescimento do feto e da placenta (LAGER e POWELL, 2012). O transporte da glicose materna para o feto, ocorre por difusão facilitada mediada pelos transportadores de glucose da família GLUT na placenta (DEVASKAR e CHU, 2016). Em roedores, foi demonstrada a expressão de duas isoformas do transportador de glicose nos septos trofoblásticos, o GLUT1 e o GLUT3 (SHIN *et al.*, 1997; TAKATA e HIRANO, 1997). O GLUT1 é a isoformas predominante e abundantemente expressa durante o início da gestação (DAS *et al.*, 1998). O GLUT1 está presente na membrana dos sinciciotrofoblastos da camada I, voltado para o lado sanguíneo materno e na membrana dos sinciciotrofoblastos da camada II, voltado para os capilares fetais, enquanto o GLUT3 é encontrado na membrana da camada de sinciciotrofoblastos que reveste o lado do sangue materno e entre as camadas de sinciciotrofoblastos I e II (SHIN *et al.*, 1997; FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Os nutrientes precisam atravessar ambas as camadas de sinciciotrofoblasto que são separadas por um espaço intercelular. Os inúmeros canais de junções comunicantes, conexina-26 fazem uma ponte direta, agindo em cooperação com o GLUT1 na difusão facilitada através das camadas trofoblásticas do labirinto (Figura 3C) (GABRIEL *et al.*, 1998; WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). Em estudo prévio, foi evidenciado que camundongos nocaute para conexina-26, morrem no útero por volta do 10º dia embrionário, devido a transferência de glicose severamente reduzida para o embrião (GABRIEL *et al.*, 1998). A capacidade de transporte de glicose se desenvolve principalmente pelo aumento no número de transportadores de glicose encontrados nas membranas das células trofoblásticas (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Em roedores, a restrição alimentar materna diminui os níveis placentários do GLUT3 acompanhada da diminuição na função de transporte de glicose sem alterar a expressão de GLUT1 ao termo (GANGULY, COLLIS L FAU - DEVASKAR e DEVASKAR, 2012).

2.2.3 Transporte de aminoácidos

O transporte de aminoácidos na barreira placentária é realizado por mecanismo de transporte ativo (WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017) através de transportadores de aminoácidos (LAGER e POWELL, 2012). O sistema A de transporte de aminoácido, consistem em três proteínas transportadoras específicas de aminoácidos neutros dependentes de Na⁺ (SNAT), SNAT1, SNAT2 e SNAT4 (WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). Em roedores, os transportadores de aminoácidos são expressos no labirinto placentário, nas células trofoblásticas gigantes e camadas sinciciais (TAKAHASHI *et al.*, 2017). O SNAT1 é o principal contribuinte para captação de aminoácidos mediado pelo sistema A, enquanto o SNAT2 responsável principalmente pela captação de aminoácidos restantes (TAKAHASHI *et al.*, 2017). A atividade do transportador do sistema A tem sido inversamente correlacionada com o peso placentário. O peso placentário reduzido que não está relacionado com restrição de crescimento intrauterino (RCIU), exigiu um alto nível de atividade transportadora desse sistema para compensação (COAN *et al.*, 2008). Além disso, a redução da atividade do sistema A de transporte de aminoácidos no 19º e 21º dia de gestação em resposta a dieta hipoproteica, reduziu a expressão de SNAT2 na placenta e esses eventos precederam o desenvolvimento de RCIU (JANSSON *et al.*, 2006).

2.2.4 Transporte de lipídios

O perfil lipídico materno é considerado um determinante importante para o crescimento fetal (KULKARNI *et al.*, 2013). A alteração no transporte e na disponibilidade de ácidos graxos pode sinalizar uma RCIU ou contribuir para alterações no desenvolvimento, resultando em doenças crônicas na vida adulta (DANIEL *et al.*, 2016). Os ácidos graxos saturados e insaturados são precursores de várias moléculas bioativas que são captados pela placenta da circulação materna por difusão (WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). Várias proteínas de transporte/ligação estão associadas ao transporte de ácidos graxos, como a translocase de ácidos graxos (FAT/CD36), a proteínas de ligação a ácidos graxos (FABPs) e as proteínas de transporte de ácidos graxos (FATPs). Essas proteínas são expressas na zona do labirinto da placenta de roedores, sendo a proteína de ligação a ácidos graxos - coração (h-FABP) e a FAT/CD36 com expressão predominante (KNIPP *et al.*, 2000). Estudos prévios apontam que o FAT/CD36 atua na captação intracelular de ácidos graxos, enquanto o h-FABP participa do transporte transcelular e utilização de ácidos graxos livre (BASS, 1985; IBRAHIMI *et al.*,

1996). Em ratas, a indução da insuficiência uteroplacentária através da ligadura bilateral das artérias e veias uterinas, promoveu aumento dos transportadores h-FABP e FAT/CD36 (NÜSKEN *et al.*, 2016). Segundo os autores, esses resultados podem estar relacionados a um mecanismo compensatório para minimizar o impacto da insuficiência uteroplacentária no neurodesenvolvimento (NÜSKEN *et al.*, 2016). A família de proteínas de transporte de ácidos graxos (FATPs) corresponde ao grupo de proteínas transmembranas integrais que juntamente com o FAT/CD36, mediam a captação de ácido graxos de cadeia longa. Em camundongos, o FATP2 é expresso no âmnio, enquanto o FATP4 na placenta. Camundongos deficientes para FATP2 ou FATP4 apresentaram embriões e placentas com peso e morfologia normais e conteúdo de triglicerídeos e expressão de genes relacionados a mobilização de ácidos graxos (MISHIMA *et al.*, 2011). Em outro estudo, ratas submetidas a dieta hiperlipídica antes e durante a gestação e que exibiram um fenótipo de obesidade, redução do crescimento fetal foi observada, juntamente com o aumento da expressão de FATP2 e redução de FATP4 na placenta, indicando possíveis prejuízos na esterificação e no transporte de ácidos graxos (SANCHES *et al.*, 2022).

O colesterol é necessário para o crescimento fetal mais tarde na gestação e essencial para a integridade da membrana celular e síntese de hormônios esteróides, ativação de várias vias de sinalização e desenvolvimento do cérebro no início da gestação (LINDEGAARD *et al.*, 2008). A placenta transporta colesterol da circulação materno para o feto, através de lipoproteínas transportadoras de colesterol (NÜSKEN *et al.*, 2016; WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). Em roedores, tanto as lipoproteínas de baixa densidade LDL, quanto de alta densidade HDL são absorvidas pelo trofoblasto (BURKE *et al.*, 2009). Acredita-se que o transportador de cassete de ligação de ATP (ABCA1) esteja envolvido na transferência de colesterol materno para o feto. A geração de camundongos deficientes em ABCA1 causou malformação placentária grave, resultando em retardo do crescimento embrionário e perda de fetos (CHRISTIANSEN-WEBER *et al.*, 2000).

2.2.5 Regulação da transferência de nutrientes na placenta

A regulação extracelular do transporte placentário é realizada principalmente por influências endócrinas diretas e pelo suprimento de nutrientes materno (BELL e EHRHARDT, 2002), além de outros insultos ou estímulos, como stress, exercício físico e redução dos níveis de oxigênio (WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017; MANGWIRO *et al.*, 2019). A expressão

de transportadores de nutriente na placenta é regulada em grande parte a via de sinalização da Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) (BAUMANN *et al.*, 2014) que tem sua expressão nos sincitiotrofoblastos no labirinto da placenta (ROOS *et al.*, 2007). Em ratas, o consumo da dieta hipoproteica na gestação, promoveu a redução da atividade do sistema A de transporte de aminoácidos, acompanhada pela redução da sinalização da mTOR na placenta e dos níveis de insulina e IGF-1 (ROSARIO *et al.*, 2011). Muitos efeitos celulares da insulina e do IGF-1 são mediados pela sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que leva a fosforilação da proteína quinase B (AKt) (TANIGUCHI, EMANUELLI e KAHN, 2006) e a AKt por sua vez, desempenha papel central na ativação a via mTOR (DENNIS *et al.*, 2001). Em outro estudo, em ratas que foram submetidas a restrição de crescimento por indução de insuficiência uteroplacentária e ao consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação, o programa de exercício em esteira, durante o período de gestação, promoveu maiores repercussões na expressão da mTOR e nos transportadores do sistema A da placenta, que em ratas que realizaram o programa de exercício no período pré-gestacional e ao longo da gestação (MANGWIRO *et al.*, 2019). Em roedores, o stress ou a administração de corticosterona exógena durante a gestação, aumentou a concentração plasmática de corticosterona, aumentou a expressão de Proteína Regulada em danos ao DNA e desenvolvimento 1 (Redd1), que atua como inibidor endógeno da via de sinalização da AKT/mTOR, reduziu o transporte de glicose placentário, GLUT1 e GLUT3 e promoveu a redução do crescimento fetal (VAUGHAN *et al.*, 2015).

2.3 PLACENTA E EXERCÍCIO NA PERSPECTIVA DA DOHAD

A teoria da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD), abrange a preconcepção, a gestação e os anos iniciais da vida, nos quais insultos/estímulos ambientais promovem mudanças no ambiente intrauterino capazes de desencadear adaptações fetais pela plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 2005; BARNES *et al.*, 2016; BARKER *et al.*, 2017). Essas adaptações podem estar relacionadas a restrição do crescimento intrauterino, aumento do risco ou proteção para doenças crônicas não transmissíveis e/ou de transtornos mentais a curto ou longo prazo (BARKER *et al.*, 2017; MONK, LUGO-CANDELAS e TRUMPF, 2019). Numerosos estudos têm buscado elucidar os mecanismos da DOHaD, destacando as crescentes evidências do papel central da placenta (MYATT, 2006; KWON e KIM, 2017a; AGUILERA *et al.*, 2022).

O conhecimento do crescimento e funcionalidade temporal da placenta ainda é limitado, em razão da complexidade deste órgão (BURTON e FOWDEN, 2014; AGUILERA *et al.*, 2022). Em humanos, apenas alguns componentes podem ser medidos sem risco e de forma não invasiva em tempo real através do uso de tecnologias e técnicas de imagem, enquanto em modelos animais, muitos aspectos envolvidos nas anormalidades do desenvolvimento e função placentária como, alterações de fatores de crescimento, transferência de nutrientes e regulação do fluxo sanguíneo, podem ser estudados em laboratório (GRIGSBY, 2016). Dentre os modelos animais utilizados em estudos experimentais, destaca-se os roedores, que têm sido amplamente utilizados por apresentarem semelhanças com os humanos na fisiologia da gestação, morfologia e função placentária, além do menor tempo de reprodução (GRIGSBY, 2016; AGUILERA *et al.*, 2022). Os estudos com roedores expostos a condições ambientais controladas, que incluem modificações do aporte nutricional, oxigênio, indução de doenças e programas de exercícios, possibilitam elucidar os mecanismos envolvidos na modificação da trajetória do crescimento e desenvolvimento do início da vida até a idade adulta e as repercussões de até mais de uma geração (AGUILERA *et al.*, 2022).

As repercussões do exercício físico materno sobre a placenta, crescimento fetal e desenvolvimento da prole, são geralmente estudadas associadas a dietas ou a condições de saúde específicas, como, obesidade e diabetes mellitus (KUCUK e DOYMAZ, 2009; SENEVIRATNE *et al.*, 2015; GARNÆS *et al.*, 2017; MANGWIRO *et al.*, 2019). No entanto, ainda é necessário compreender a influência de diferentes tipos de exercício em diferentes intensidades para cada período gestacional para então serem utilizados em diferentes condições fisiopatológicas.

Em humanos, Clapp e colaboradores, foram os pioneiros na investigação do efeito do exercício físico durante a gestação sobre o crescimento placentário, especificamente sobre os parâmetros histomorfométricos (CLAPP *et al.*, 2000a; CLAPP *et al.*, 2002). Os programas de exercícios utilizados nos estudos de James Clapp, consistiram em exercícios predominantemente aeróbicos com intensidade mantida entre 55-60% do VO_{2max} pré-gestacional e com volume de exercícios ajustado pela manipulação na duração da sessão de treinamento. Segundo Clapp e colaboradores (2000), o programa de exercício iniciado entre a 8ª e 9ª semana de gestação, com 3-5 sessões/semana, 20 minutos/sessão, promoveu maior volume funcional e das vilosidades da placenta, e maior peso corporal e massa corporal magra do neonato. Em outro estudo, Clapp e colaboradores (2002), utilizaram 3 diferentes variações do programa de exercício citado acima, sendo 5 sessões/semana, com duração entre 20-60

minutos. Os programas de exercício também foram iniciados entre a 8ª e 9ª semana de gestação e seguiram até o parto, no entanto, houve ajustes na duração das sessões na 24ª semana de gestação para originar as 3 variações do programa com base no volume de exercício, (1) com alto volume, (2) baixo volume ou (3) nenhuma alteração no volume. Nesse estudo, foi identificado que o alto volume de exercícios da metade para o final da gestação reduziu simetricamente o crescimento feto-placentário, enquanto a redução do volume de exercícios, aumentou o crescimento feto-placentário, com maior volume funcional, espaço intervilo, volume das vilosidades placentária e maior peso ao nascer, percentual de gordura corporal e massa corporal magra de seus descendentes (CLAPP *et al.*, 2002).

O crescimento placentário também foi avaliado em trabalhos anteriores com gestantes e exercício físico (CLAPP e RIZK, 1992; JACKSON *et al.*, 1995), no entanto, apesar dos autores mencionarem exercício físico, nessas pesquisas, não foram apresentados os parâmetros de controle de um programa de exercício. Segundo Clapp e Rizk (1992), gestantes que realizaram exercício aeróbico recreacional com corrida ou natação ao longo do segundo trimestre, com no mínimo de 3 sessões/semana, 20 minutos/sessão e aproximadamente 50% de uma capacidade máxima, não especificada no estudo, apresentaram maior volume placentário avaliado na 16ª, 20ª e 24ª semana de gestação quando comparadas ao grupo não exercitado. Enquanto o estudo de Jackson e colaboradores (1995), investigou gestantes que foram corredoras ou dançarinas bem condicionadas, que realizavam pelo menos 30 minutos de exercício aeróbico contínuo em 3 ou mais vezes por semana, antes da gestação e voluntariamente continuaram suas atividades durante todo período gestacional ou reduziram após as primeiras 20 semanas de gestação. Ambos os grupos exercitados apresentaram aumento do volume vascular total, volume capilar e área de superfície da placenta, com resultados mais relevantes para grupo que continuou o exercício durante todo período de gestação, quando considerados os parâmetros histomorfométricos associados à taxa de perfusão e função placentária (JACKSON *et al.*, 1995).

Até o presente momento, não foram identificados outros estudos com humanos que tenham avaliado o efeito do exercício sobre os parâmetros histomorfométricos da placenta além dos citados acima. Em geral, os estudos posteriores a esses, avaliaram o peso da placenta, eficiência placentária (peso do recém-nascido/ peso da placenta) e a expressão de genes placentários (PRICE, AMINI SB FAU - KAPPELER e KAPPELER, 2012; RAMÍREZ-VÉLEZ *et al.*, 2013; BARAKAT *et al.*, 2018; HARDY *et al.*, 2021). Os programas de exercício dos estudos consistiram em exercícios aeróbicos ou combinados (aeróbicos e resistidos), com a

frequência de 3-5 vezes por semana, duração de 45-60 minutos, de intensidade leve a moderada, realizados principalmente do segundo para o terceiro trimestre de gestação (RAMÍREZ-VÉLEZ *et al.*, 2013; BARAKAT *et al.*, 2018; HARDY *et al.*, 2021). Os resultados desses estudos não apresentam diferenças significativas no peso da placenta ou na eficiência placentária (PRICE, AMINI SB FAU - KAPPELER e KAPPELER, 2012; BARAKAT *et al.*, 2018; HARDY *et al.*, 2021), exceto o estudo de Ramírez-Vélez e colaboradores (2013). Segundo os autores, o protocolo de exercícios combinados de intensidade leve (3 sessões/semana, 60min/sessões) realizado no segundo e terceiro trimestre, promoveu redução do peso da placenta e aumento da eficiência placentária, acompanhado do aumento da expressão da expressão do óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e produção de óxido nítrico (NO), ambos envolvidos com a neutralização das ações dos vasoconstritores e redução de espécies reativas de oxigênio, sugerindo um menor nível de stress oxidativo na placenta de mulheres que se exercitavam (RAMÍREZ-VÉLEZ *et al.*, 2013). Em outro estudo, Hardy e colaboradores (2021), verificou que o exercício aeróbico, >150min/semana, em intensidade leve a moderada iniciado no segundo trimestre até o parto, não promove diferenças no peso do recém-nascido e peso ou eficiência placentária, no entanto, aumenta a expressão de angiogenina 1, sem aumento do stress do retículo endoplasmático na placenta, representando aumento da angiogênese placentária, um dos principais determinantes para o crescimento fetal (HARDY *et al.*, 2021).

Em estudos com roedores, dois principais modelos experimentais de exercício físico são utilizados para avaliar as repercussões placentárias, a corrida em esteira motorizada e a natação que visam mimetizar os efeitos do treinamento aeróbico e de resistência apresentados pelos humanos. No entanto, vale ressaltar que em ratos, o exercício de natação de alta intensidade, utilizando sobrecarga, promove stress endócrino e metabólico, com maiores concentrações séricas do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona e de glicose e lactato, quando comparado aos ratos que realizaram corrida em esteira motorizada na mesma intensidade (CONTARTEZE *et al.*, 2007), sugerindo cautela na extrapolação dos resultados como efeito exclusivamente do exercício físico.

Segundo De Resende e colaboradores (2012), ratas Wistar-Kyoto, submetidas a protocolo de natação, 5 dias/semana, com o aumento progressivo do tempo de sessão de 10 para 120 min, durante 9 semanas no período pré-gestacional e ao longo gestação, apresentaram aumento da espessura e volume da placenta sem modificações no número de vasos sanguíneos e peso placentário e fetal (D RESENDE *et al.*, 2012). Em outro estudo, ratas Wistar submetidas ao protocolo de natação, 5 dias/ semana, com o aumento progressivo do tempo de sessão de 10

para 60 min, realizado apenas durante a gestação, apresentaram menor peso placentário e fetal e menor área do labirinto (VOLPATO *et al.*, 2015). Enquanto Barzanjeh e colaboradores (2016), utilizando o mesmo protocolo de natação que Volpato e colaboradores (2015), observaram menor número de vasos sanguíneo na placenta sem nenhuma alteração no peso fetal.

Em estudo utilizando corrida em esteira motorizada, camundongos C57BL/6J gestantes com consumo de dieta padrão, foram submetidos ao protocolo de exercício em esteira, 60min/dia, todos os dias até o dia embrionário (E)16.5, com intensidade ajustada para cada fase de gestação: 40% $VO_{2máx}$ do E1.5 ao E7.5, 65% $VO_{2máx}$ do E8.5 ao E14.5 e 50% $VO_{2máx}$ do E15.5 ao E16.5 (SON *et al.*, 2019). Nesse estudo, foram observados maior peso da placenta e redução da eficiência placentária e aumento da expressão do mRNA do transportador de ácido graxo CD36, da interleucina 6 (IL-6), VEGF, VEGFR1, fator indutor de hipoxia1- α (HIF-1 α) e da via de sinalização AMPK, sugerindo aumento do metabolismo e vascularização placentária em resposta ao treinamento em esteira (SON *et al.*, 2019). Em outro estudo com ratas Sprague-Dawley, o protocolo de exercício em esteira, 60 min/dia, 5 dias/semana, 60-70% $VO_{2máx}$, no período pré-gestacional até o 18º dia gestação, promoveu menor peso fetal e placentário (MOTTOLA *et al.*, 2007).

Mangwiro e colaboradores (2021), utilizaram ratas Wistar-Kyoto e protocolos de exercício em esteira motorizada, 5 dias por semanas, durante o período pré-gestacional e gestacional (grupo Exercitado) ou apenas durante a segunda e terceira semana de gestação (grupo Gestação-Exercitado). O treinamento pré gestacional foi realizado em duas semanas, com intensidade progressiva de 20 min/dia – 15 m/min para 60 min/dia – 20 m/min. No período de gestação, o tempo e velocidade da sessão foram ajustados: 1ª semana: 50 min/dia – 17 m/min; 2ª semana: 30 min/dia – 13 m/min e 3ª semana: 20 min/dia – 11 m/min (MANGWIRO *et al.*, 2021). O grupo exercitado, apresentou maior peso fetal de machos e fêmeas e aumento da eficiência placentária apenas para os machos, enquanto o grupo gestação-exercitado, os fetos de ambos os sexos apresentaram aumento na eficiência placentária sem alteração no peso fetal (MANGWIRO *et al.*, 2021). No grupo gestação-exercitado também foram observados menor peso da placenta de fêmeas e maior área da placenta e da zona do labirinto de fetos machos (MANGWIRO *et al.*, 2021).

A maioria dos estudos citados nesta revisão, utilizam programas de exercício aeróbio (CLAPP *et al.*, 2002; MOTTOLA *et al.*, 2007; MANGWIRO *et al.*, 2018; SON *et al.*, 2019), enquanto poucos estudos apresentam a combinação de exercícios aeróbios e resistidos

(RAMÍREZ-VÉLEZ *et al.*, 2013; BARAKAT *et al.*, 2018). Apesar de pouco explorado, deve-se ressaltar os estudos com programas de treinamento apenas com treinamento resistido durante a gestação (BARAKAT, LUCIA e RUIZ, 2009; DE BARROS *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2021a).

Em humanos, De Barros e colaboradores (2010) demonstrou que o treinamento resistido de intensidade leve a moderada durante a gestação, melhorou o controle glicêmico em mulheres com diabetes gestacional (DE BARROS *et al.*, 2010). Em outro estudo, o treinamento resistido de intensidade leve durante o segundo e terceiro semestre de gestação reduziu do ganho de peso gestacional sem impacto negativo sobre o tamanho do recém-nascido (BARAKAT, LUCIA e RUIZ, 2009). Em ratas, o exercício resistido voluntário durante a gestação, utilizando a escalada em torre, com o propósito de acessar o alimento, não altera os níveis de corticosterona materno, mas reduz o ganho de peso gestacional e promove maior comprimento dos fetos e maior peso da placenta (ROSA *et al.*, 2011). No entanto é importante destacar que nesse modelo de treinamento não consegue realizar manipulação das variáveis de um treinamento físico, como a frequência e carga de treinamento.

Para nosso conhecimento, os estudos de Meireles e colaboradores (2021) são os únicos que utilizaram o treinamento resistido em escada durante a gestação. Os autores utilizaram um protocolo, 3 sessões/semana, 4 a 9 subidas/dia, 35-75% da capacidade de carga máxima, inclinação da escada mantida em 85° e tempo de descanso mantido em 120 segundos (MEIRELES *et al.*, 2021c). O treinamento resistido durante a gestação, não alterou o desenvolvimento físico da prole de machos, mas promoveu mudanças transitórias no peso corporal e eixo anteroposterior e látero-lateral (MEIRELES *et al.*, 2021c). Além disso não foram observadas alterações na concentração de corticosterona na mãe exercitada ou na prole (MEIRELES *et al.*, 2021c). Em outro estudo, Meireles e colaboradores (2021) utilizaram 3 diferentes protocolos de treinamento: (1) apenas durante a gestação, considerando as mesmas variáveis do estudo anterior, (2) apenas durante o período pré-gestacional (6 semanas), utilizando 50%-100% da capacidade carga máxima e (3) durante o período pré-gestacional e gestacional (MEIRELES *et al.*, 2021a). Os resultados mostram que a prole de ratas que se exercitaram apenas na gestação apresentaram melhor desempenho em tarefas de aprendizagem e memória, associado a menor quantidade de histona deacetilase-2 (HDAC2) no cérebro, enquanto o exercício em ambos os períodos não promoveu nenhuma modificação na função cognitiva ou marcadores de neuroplasticidade em torno dos 80 dias de idade (MEIRELES *et al.*, 2021a).

Os estudos clínicos e experimentais com exercício físico dentro da perspectiva DOHaD, avaliando as repercussões placentárias e fetais, apresentam diferentes resultados, em virtude dos diferentes dos protocolos de treinamento utilizados (CLAPP e RIZK, 1992; D RESENDE *et al.*, 2012; VOLPATO *et al.*, 2015; MANGWIRO *et al.*, 2018; MEIRELES *et al.*, 2021b). O tipo de exercício físico, intensidade, e o momento do início do exercício, são fatores importantes a serem considerados e podem estar relacionados as alterações do fluxo sanguíneo no leito placentário e consequente repercussão sobre a entrega de nutrientes e oxigênio. Sessões contínuas de exercício materno têm efeitos agudos e crônicos no fluxo sanguíneo do leito placentário (CLAPP, 2003). Durante o exercício físico, parte do fluxo de sangue é desviado das vísceras para o músculo e a pele (ROWELL, 1974). Na gestação esse desvio pode promover redução no fluxo de sangue no leito placentário, proporcional à intensidade do exercício e a massa muscular utilizada (CLAPP, 2003). No entanto, a magnitude da redução no fluxo de sangue para placenta é atenuada no final gestação em mulheres que continuam a se exercitar regularmente com exercícios aeróbicos (CLAPP *et al.*, 2000b). Interessantemente, em estudo recente, foi observado que mulheres atletas recreacionais com 13 a 28 semanas de gestação o treinamento resistido de 1 repetição máxima não resultou em redução significativa do fluxo sanguíneo placentário do estado de repouso (GOULD *et al.*, 2022). Em outro estudo, com mulheres treinadas, o exercício aeróbico (90% da frequência cardíaca máxima) na gestação, promoveu bradicardia fetal e alto índice de pulsatilidade da artéria umbilical com redução no fluxo sanguíneo para menos de 50% do valor inicial (CLAPP *et al.*, 2016). Como limitações, deve ser considerado que a relação hemodinâmica materno-fetal e o exercício ainda não pode ser estudada com precisão por meio do uso das tecnologias disponíveis, como o ultrassom, sendo necessárias novas técnicas para medir o fluxo sanguíneo placentário (GOULD *et al.*, 2022).

Diante dos achados tratados nessa revisão, é importante ressaltar que o avanço nas recomendações para o exercício físico materno acontece em decorrência do aumento de evidências clínicas e experimentais, principalmente para o exercício aeróbio em diferentes intensidades. No entanto, com relação ao exercício resistido, apesar de prévios estudos indicarem positivos desfechos durante a gestação, ainda é um campo de pesquisa pouco explorado e com isso, as recomendações sobre esse tipo de exercício permanecem cautelosas. A possibilidade de oferecer subsídios para intervenção do exercício resistido para promoção da saúde materno e fetal e tratamento não farmacológico para diversas doenças, compreende uma nova perspectiva para a pesquisa nessa temática. Além disso, o crescente número de mulheres

em idade reprodutiva que praticam o treinamento resistido também deve contribuir para impulsionar o desenvolvimento de novos estudos com o objetivo de assegurar a segurança materna, placentária e fetais na prática.

3 HIPÓTESE

O treinamento resistido antes e durante a gestação, reduz o ganho de peso gestacional e o número e tamanho dos adipócitos maternos; aumenta a performance reprodutiva e o transporte de nutrientes na placenta com repercussões sobre o crescimento fetal. Esses desfechos são dependentes da variação da carga do treinamento durante a gestação.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar diferentes protocolos de treinamento resistido durante a gestação e analisar suas repercussões sobre o desempenho materno, placentário e fetal.

4.2 ESPECÍFICOS

- Elaborar diferentes protocolos de treinamento físico resistido em escada para ratas gestantes;

Avaliar nas ratas gestantes submetidas a treinamento resistido:

- Consumo alimentar;
- Evolução do peso corporal;
- Perfil bioquímico sérico;
- Performance reprodutiva;
- Morfometria do tecido adiposo branco;
- Conteúdo de glicogênio muscular;

Avaliar nas placentas de ratas gestantes submetidas a treinamento resistido:

- Morfometria e número de células placentárias;
- Expressão de RNAm de transportadores de nutrientes e fatores de crescimento placentário;

Avaliar nos fetos de ratas gestantes submetidas a treinamento resistido:

- Crescimento somático;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 QUESTÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 0059/2018 (ANEXO A). Nos experimentos o cuidado e manejo ético dos animais utilizados na experimentação foram garantidos seguindo as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 35 ratas albinas da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Foram adotados alguns critérios para escolha das ratas: idade entre 60 e 70 dias, nulíparas, não possuíram parentesco familiar, e peso entre 180 e 220 gramas. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo 12/12h [ciclo claro (20:00 às 08:00 h) e ciclo escuro (08:00 às 20:00 h)] e livre acesso à água e alimentação. Todas as manipulações foram realizadas durante o ciclo escuro. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 5 dias e após este período os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais: Grupo Controle (C); Grupo Teste Máximo (TM); Grupo Treinado intensidade constante (TIC); Grupo Treinado intensidade decrescente (TID); Grupo Treinado intensidade mista (TIM).

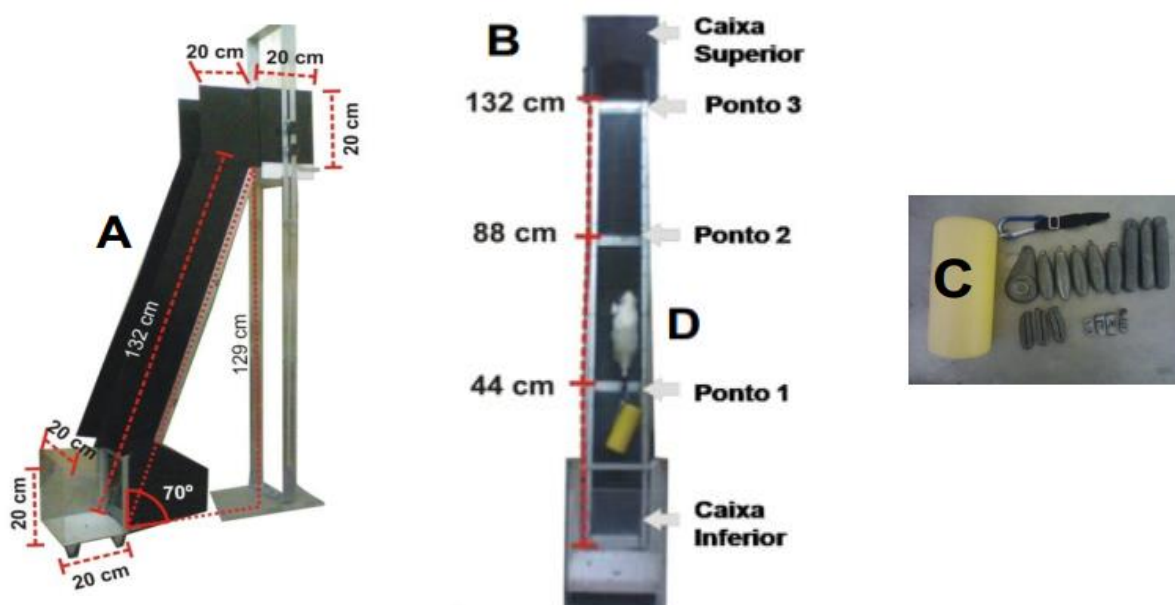
De acordo com o grupo experimental, as ratas submetidas ou não ao treinamento resistido, após o período pré gestacional de 4 semanas, foram colocadas para acasalar na proporção 1 fêmeas para cada macho. Em acasalamentos de ratas dos grupos treinados com duração superior a 2 dias, ao 3º dia uma das ratas foram separadas para ainda realizarem o treinamento resistido pré-gestacional e posteriormente retornar para o acasalamento. O diagnóstico do estado de prenhez, foi realizado através do esfregaço vaginal e na visualização da presença de espermatozoides na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002). Após a confirmação da gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas, onde passaram a ter livre acesso a água e a dieta padrão do biotério e iniciaram o programa de treinamento resistido gestacional. No experimento, as ratas foram sacrificadas antes do parto no 20º dia de gestação.

5.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO RESISTIDO PRÉ-GESTACIONAL E GESTACIONAL

Foram elaborados diferentes protocolos de treinamento resistido para ratas gestantes. As repercussões do treinamento foram avaliadas até o 20º dia de gestação. As ratas foram divididas de acordo com as manipulações que foram submetidas: grupo (TM=6) que realizou apenas o teste de capacidade carregamento máximo (TCM) semanalmente; grupos treinados (TIC=8), (TID=7) e (TIM=7) que realizaram o TCM e o programa de treinamento resistido e o grupo controle (C=7) que não realizou nenhuma das manipulações indicadas acima.

O aparato de treinamento consistiu em uma escada com 132 cm e 87 degraus metálicos e angulação mantida em 70º entre a base da escada e o solo (Figura 4A) desenvolvida pelo nosso grupo (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016). As ratas percorreram a extensão da escada com uma sobrecarga progressiva fixada em sua cauda. O aparato de carga consistiu em um suporte para fixar a carga na cauda do rato, formada por uma fita semi-elástica com um mosquetão na ponta e um recipiente cilíndrico para colocação das cargas (Figura 4C).

Figura 4 – Aparato de treinamento



(A) Visão lateral (escada com altura: 129cm; largura: 20cm; comprimento: 132cm; com 87 degraus e 1 cm entre os degraus). (B) Visão frontal, descrição dos pontos onde a rata será colocada (caixa inferior transparente, ponto 1 a 44 cm da base, ponto 2 a 88 cm da base, ponto 3 a 132cm da base e caixa superior escura). (C) O suporte para fixação de carga consiste de uma fita para fixação (formada por uma fita semi-elástica com um mosquetão na

ponta) e um recipiente onde as cargas serão colocadas. **(D)** Rato subindo a escada com sobrecarga fixa em sua cauda. Fonte (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016).

Todas as ratas submetidas às manipulações foram adaptadas ao aparato de treinamento durante 5 dias de acordo com o protocolo (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016) com as seguintes adaptações: no quinto dia, as subidas foram feitas com carga de 10% do peso corporal (PC), e o intervalo entre as subidas foi de 40 segundos do primeiro ao terceiro dia e 50 segundos do quarto ao quinto dias. Quarenta e oito horas após o período de adaptação, todas as ratas foram submetidas a um teste de capacidade de carregamento máximo (HORNBERGER e FARRAR, 2004), para estimar a sobrecarga máxima e acompanhar o ganho de força ao longo das semanas de treinamento. No primeiro teste de capacidade de carregamento máximo (TCM), as ratas subiram inicialmente com uma sobrecarga de 75% do seu peso corporal (HORNBERGER e FARRAR, 2004). Após cada subida de sucesso foi adicionado 30 gramas na sobrecarga até o animal realizar uma tentativa falha. Após 2 falhas consecutivas, a última sobrecarga com a qual o animal conseguir subir, foi registrada e considerada como máxima. Na determinação da capacidade de carregamento máximo (CCM) das semanas subsequentes, as primeiras subidas foram realizadas com 80% e 100% da sobrecarga máxima da semana anterior e em seguida adicionados 30 gramas conforme indicado acima. Os intervalos entre as subidas, em todos os testes de capacidade de carregamento máximo, foram mantidos em 120 segundos (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016). As ratas do grupo Não-Treinado somente foram submetidas aos testes de capacidade de carregamento máximo com o objetivo de avaliar a influência da realização do teste sobre as características materna, placentárias e fetais.

Antes da gestação, todas as ratas dos grupos treinados foram submetidas a um programa de treinamento a fim de que elas sejam consideradas fisicamente ativas antes do período gestacional. O programa de treinamento resistido antes da gestação consistiu na realização de 7 a 8 subidas, 5 dias por semana, durante 3 semanas, cada subida permite 10 a 16 movimentos alternados. A intensidade da sessão será mantida em 80% da capacidade de carregamento máximo (CCM). O tempo de descanso entre as subidas foi mantido em 90 segundos.

Após a confirmação da gestação, no dia 1, foi iniciado o programa de treinamento resistido para gestantes. A intensidade do treinamento foi ajustada para cada semana de gestação, de acordo com o teste de carregamento máximo dos três grupos treinados:

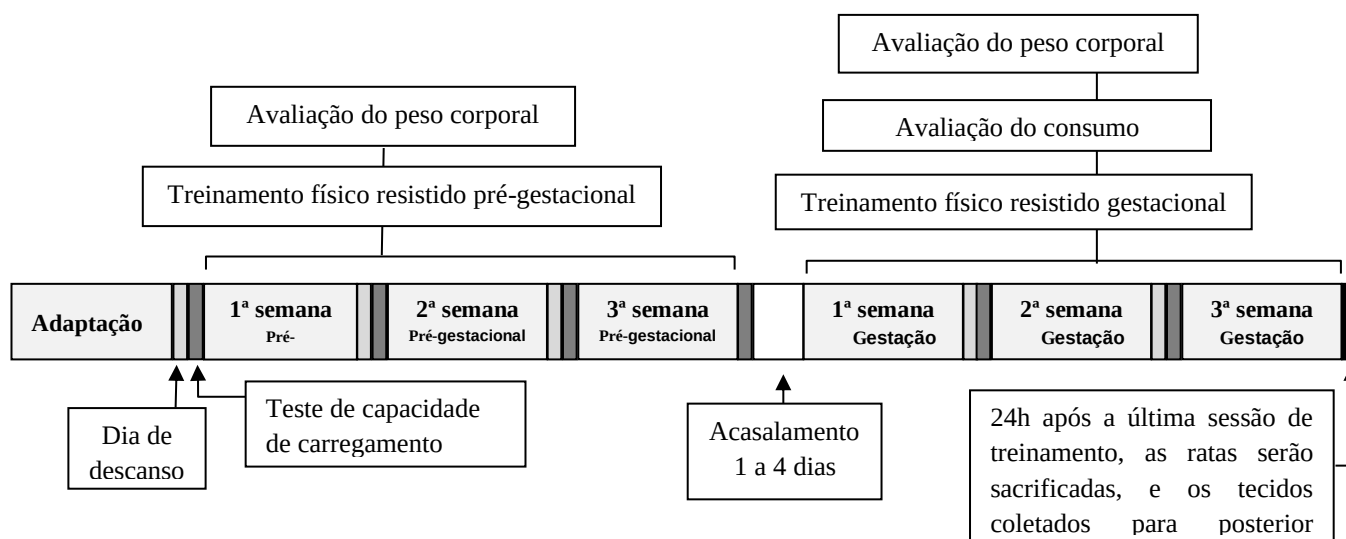
- Grupo Treinado intensidade constante (TIC, n=8): Treinará na 1ª, 2ª e 3ª semana a 80% da CCM.

- Grupo Treinado intensidade decrescente (TID, n=7): Treinará na 1ª e 2ª semana a 80% da sobrecarga máxima e na 3ª semana a 50% da CCM.
- Grupo treinado intensidade mista (TIM, n=6): Treinará na 1ª semana a 50% da CCM, na 2ª semana a 80% da CCM e na 3ª semana a 50% da CCM.

Todas as ratas dos grupos treinados encerraram o protocolo de treinamento no 5º dia da terceira semana ao 20º dia de gestação. Todas as sessões de treinamento e testes de capacidade de carregamento máximo foram realizadas no horário entre 13h00min e 17h00min no ciclo escuro.

O desenho experimental das manipulações das ratas está disposto na Figura 5.

Figura 5 – Desenho Experimental



5.4 AVALIAÇÃO DAS MÃES

5.4.1 Avaliação do desempenho das ratas no TCM e treinamento resistido

Os valores da carga máxima (g) individual obtida nos TCMs e o tempo total de subida semanal do programa de treinamento resistido foram registrados no período pré-gestacional e gestacional. Para o cálculo da carga relativa e da porcentagem do incremento da capacidade de carregamento máximo (%ICCM) as seguintes fórmulas foram utilizadas: Carga relativa = (carga máxima (g) / peso corporal (g)) e IMLC% = [Carga máxima carregada no teste (g) x 100 / carga máxima transportada no primeiro teste (g)] - 100.

Para calcular o trabalho de treinamento em joule e a performance em Watts, as seguintes fórmulas foram utilizadas: Trabalho de treinamento= (carga máxima + peso corporal) $\times g \times \Delta h \times n^{\circ}$ repetições) e Performance = trabalho de treinamento/ Tempo de subida) (ROUMANILLE *et al.*, 2020). Foram consideradas para o cálculo: a carga máxima e peso corporal em Kg, g a constante da gravidade da Terra em 9,7819 m/s², Δh a distância subida na escada 0,838 metros, N o número médio diário de repetições (subidas) e a média do tempo de subida diária em segundos.

5.4.2 Avaliação do peso corporal

O peso corporal das ratas foi avaliado semanalmente durante os períodos de adaptação, treinamento pré-gestacional e gestacional. Foi utilizada uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,01g. Para avaliação do percentual de ganho de peso foi utilizada a fórmula: %GP= [peso do dia(g) $\times$ 100/Peso do 1º dia (g)] -100 (BAYOL *et al.*, 2004). Todas as avaliações foram realizadas entre 13h00min e 14h30min.

5.4.3 Consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado semanalmente durante os períodos de adaptação, treinamento pré-gestacional e gestacional. Foi mensurada a diferença entre a quantidade de ração ofertada e ração rejeitada (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008). Foi utilizada uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,01g. A avaliação do consumo alimentar foi realizada entre 7h00min e 08h00min.

5.4.4 Coleta de amostras

As ratas gestantes foram sacrificadas no 20º dia de gestação por meio de decapitação. O sangue do tronco foi coletado. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro armazenado em freezer -80°C para posterior análise bioquímica. As ratas foram laparotomizadas e os cornos uterinos removidos para a coleta das placentas e fetos. As duas primeiras placentas macho e fêmea que foram coletadas considerando a contagem no corno uterino direito e esquerdo, uma foi fixada em formol a 10% por 48h e posteriormente colocados em álcool 70% até a análise histológica e a outra imediatamente congeladas e transferidas para o freezer a -80°C até análise

da expressão gênica. Uma ou duas placentas e os respectivos fetos macho e fêmea foram coletados e pesados. Os fetos foram separados para avaliação posterior. O músculo sóleo das mães foi retirado por meio de uma incisão na face lateral da pata posterior e seccionado no tendão. Os músculos foram imediatamente congelados no n-hexano resfriado em gelo seco e posteriormente transferidos para o freezer a -80°C até análise do glicogênio muscular. As amostras de tecido adiposo branco abdominal (TAB) materno foram coletadas, pesados e fixadas em formol a 10% por 48h e posteriormente colocados em álcool 70% até a análise. Para o peso dos fetos, placentas e TAB materno foi utilizada balança Marte com capacidade máxima de 330g e sensibilidade de 0,001g.

5.4.5 Avaliação da performance reprodutiva

O número total dos fetos machos e fêmeas e de sítios reabsorvidos de cada ninhada foi registrado. A identificação do sexo dos fetos, foi realizada pela avaliação da distância anogenital, que compreende o espaço entre o ânus e a genitália. Foram consideradas fêmeas, o feto que possuir menor distância anogenital quando comparada ao macho (O'MALLEY, 2005). A razão sexual foi calculada através da seguinte fórmula: Razão sexual (%) = nº machos / (nº de machos + nº de fêmeas) x 100 (ONODA *et al.*, 2014). A eficiência placentária de fêmeas e machos foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Eficiência da placentária = (peso fetal / peso placentário) (NAPSO *et al.*, 2019). O índice de crescimento fetal foi calculado através da seguinte fórmula: peso fetal(g) / ganho de peso gestacional (g) (SANCHES *et al.*, 2022).

5.4.6 Análises do perfil bioquímico sérico

Os soros coletados foram analisados pelo método colorimétrico enzimático para determinação dos níveis séricos de glicose, albumina, colesterol total, e triglicerídeos. Foram utilizados Kits da Labtest® (MG/Brasil). Os procedimentos seguiram os protocolos descritos pelo fabricante. A análise foi realizada em triplicata. O espectrofotômetro BIOTEK® Epoch foi utilizado para leitura.

5.4.7 Análise histomorfométrica do glicogênio muscular

O músculo sóleo foi fixado em suporte com utilização do *Tissuetek*® e mantidos a -20°C. Para detecção de glicogênio muscular foi utilizado a coloração de ácido periódico de

Schiff (PAS). As secções transversas de 8µm de espessura para as análises foram obtidas através do criostato (SLEE MNT). Inicialmente, os cortes foram hidratados em água por 2 minutos e incubados em solução de ácido periódico a 0,5% por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 60 minutos em reagente de Schiff e lavados em água corrente por 5 minutos. Por fim, os cortes foram imersos por 20 minutos em hematoxilina de Harris e lavados novamente em água corrente para remover o excesso de corante. Após a secagem, os cortes foram montados com New Entellan. Os campos microscópicos foram obtidos utilizando câmera de vídeo acoplada ao microscópio Olympus® Bx50 (objetiva 40X) e visualizadas e registradas no computador com o auxílio do software de captação de imagens LEICA LAS ES®. Na análise morfométrica do músculo sóleo foi considerada a contagem de um total de 1100 pontos de interseção por animal utilizando o plugin de contagem de células da Imagem J (versão 1.51p). (NIH, EUA).

5.4.8 Análise morfométrica do tecido adiposo

Os fragmentos de tecido adiposo branco da região abdominal foram processados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas pelo xilol e impregnados e incluídos em parafina. Após o processo de parafinização, foi utilizado micrótomo para obtenção dos cortes histológicos com 4µm de espessura e em seguida realizada a técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.). Os campos microscópicos foram obtidos utilizando câmera de vídeo acoplada ao microscópio Olympus® Bx50 (objetiva 40X) e visualizadas e registradas no computador com o auxílio do software de captação de imagens LEICA LAS ES®. Para área e perímetro de célula, foram consideradas 100 células por animal e utilizado o software Image J versão 1.51p.

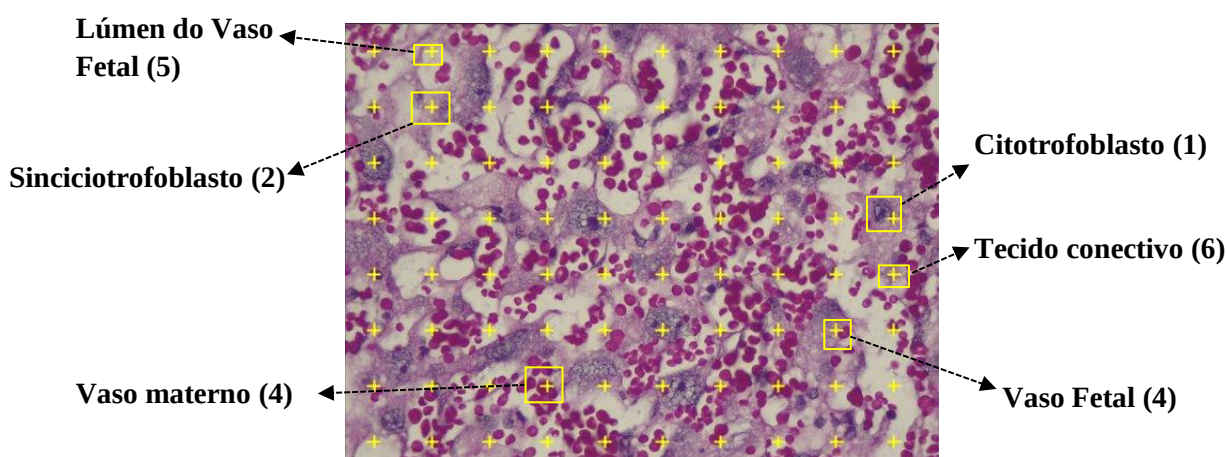
5.5 AVALIAÇÕES DA PLACENTA

5.5.1 Análise Morfométrica da Placenta

O processamento das placentas macho e fêmea para coloração em Hematoxilina e Eosina, seguiu os procedimentos para coloração e obtenção dos campos microscópicos descritos no item 5.4.9. Foram contabilizados 10 campos por animal e considerada a contagem de um total de 1100 pontos de interseção por animal utilizando o plugin de contagem de células da Imagem J (versão 1.51p). (NIH, EUA). A análise da composição celular da placenta foi

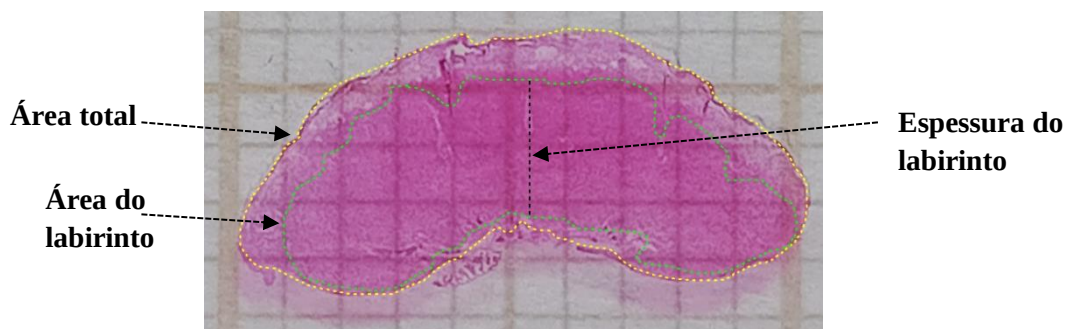
restrita a região do labirinto. As células foram classificadas em: (1) citotrofoblastos (CT), (2) sinciotrofoblastos (ST), (3) vasos maternos (VM), (4) vasos fetais (VF), (5) lúmen do vaso fetal, (6) tecido conectivo (Figura 6), seguindo (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019). Para análise da área total da placenta (amarelo), área (verde) e espessura do labirinto (preto) (Figura 7), imagens adquiridas por câmera digital mensuradas utilizando as ferramentas Free Hand e straight line do Image J.

Figura 6 – Análise da composição celular da zona do labirinto da placenta no 20º dia de gestação.



Fonte: Thaynan Oliveira, 2022.

Figura 7 – Imagem panorâmica da placenta no 20º dia de gestação.



Fonte: Thaynan Oliveira, 2022.

5.5.2 Análise da expressão de genes na placenta

Para análise da expressão gênica, amostras de 3-5 animais de cada grupo foram utilizados. A placenta foi dividida longitudinalmente (considerando o cordão umbilical) ao meio e foi homogeneizada em reagente Trizol® (Invitrogen) para subsequente extração do RNA total. Os procedimentos de extração seguiram o recomendado pelo fabricante. Em resumo, 50-100mg de tecido foram homogeneizados em 1ml de Trizol®, depois de 5 minutos de incubação, 200µl de clorofórmio foram adicionados para permitir a separação das fases. Após centrifugação, a fase aquosa foi recuperada, e 500 µl de álcool isopropílico adicionado, para precipitar o RNA. Após centrifugação, o pelete foi lavado em etanol a 75% e redissolvido em água livre de RNases. O RNA total foi quantificado utilizando-se Nanodrop e sua pureza verificada pela relação A260/280 sendo usadas apenas amostras que obtiveram um grau de pureza superior a 1,9. Em seguida 700pg de RNA foi utilizado para amplificação PCR em tempo real utilizando SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) seguindo as orientações do fabricante. Foi analisada a expressão gênica dos transportadores de glicose (*Glut1* e *Glut3*), do transportador de aminoácido no sistema A (*Snat1*), da proteína de ligação a ácido graxo (*Fabp3*), da proteína de transporte de ácido graxo (*Fabp3*), da proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (*mTOR*), do fator de crescimento placentário (*Pgf*), do fator Neurtotrófico (*Ntf4*), da enzima 11-beta-hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (*11β-Hsd2*). O gene beta-2 microglobulina (*B2m*) foi o controle endógeno. Os níveis relativos de expressão de mRNA em diferentes amostras foi calculado usando o método comparativo 2- $\Delta\Delta CT$.

Tabela 2 – Sequência de primer RT-qPCR

Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (3' – 5')
<i>Glut1</i>	CCAAACTGACAGATCTCGGG	CTGGAGCCATCAAAGTCCTG
<i>Glut3</i>	ATGGGGACAGCGAAGGT	CCTCGCTTGGTAGGTCTTC
<i>Snat1</i>	TCCCTAGGCAGACCTTGACA	GCAGTGAATAGAGATGCCCGA
<i>Fatp4</i>	GTCTCAAGAAGTCGGGATCG	CCCTCCCTAAGACAAGGACA
<i>Fabp3</i>	TACCTGGAAGCTAGTGGACAG	CTTGGTCATGCTAGCCACC
<i>mTOR</i>	CGGTGAGGTCCGAGTTTAAG	AGTTTTCTGCCTCTTGTGGG
<i>Pgf</i>	GTCTGCTGGGAACAACCTCAA	ACTACAGCGACTCAGAAGGA

<i>Ntf4</i>	GAGGACCCTGACTTACCCT	AGCCCCAGCTCATAATTG
<i>Hsd11b2</i>	CAAGGGGACGTATTGTGACC	GATGCTGACCTTGATACCCC
<i>B2m</i>	GCCATTCAGAAACTCCCCA	CAGTTGAGGAAGTTGGGCTT

Fonte: Thaynan Oliveira, 2022

5.6 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA NOS FETOS

Fetos fêmea e macho foram avaliados quanto às medidas do eixo látero-lateral do crânio (ELLC), eixo ântero-posterior do crânio (EAPC), comprimento da cauda (CC) e eixo longitudinal do corpo (EL) (SILVA, 2005). Para as medidas de CC e EL o animal foi posicionado em decúbito ventral em uma base plana e lisa. Nas medidas de ELLC e EAPC, a cabeça do feto foi contida com a mão do avaliador ficando entre os dedos indicador e polegar. Foram consideradas as seguintes medidas: CC - Medida da distância entre a ponta e a base da cauda; ELLC Medida da entre os pavilhões auriculares; EAPC - Medida da distância entre o focinho e a articulação da cabeça com o pescoço; EL - Medida da distância entre o focinho e a base da cauda. O paquímetro digital (Zaas, com 0,01 mm de precisão) foi utilizado para obtenção das medidas.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 7® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente, para determinar se os dados apresentam uma distribuição normal, foram utilizados os testes D'Agostino-Pearson ou Shapiro-wilk (quando o n foi menor que 30).

O percentual de ganho de peso e do conteúdo de glicogênio muscular, parâmetros bioquímicos, consumo alimentar total, razão sexual, parâmetros histomorfométricos e de expressão gênica da placenta, foram analisados por ANOVA one-way (treinamento) seguido do pós-teste de Tukey. Os dados de acompanhamento do peso corporal, ingestão alimentar, teste máximo, medidas do treinamento resistido e os parâmetros de crescimento fetal (machos e fêmeas foram analisados por ANOVA two-way medidas repetidas (treinamento x tempo) e (treinamento x sexo) seguido do pós-teste de Tukey. Para a análise da área e perímetro dos adipócitos foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Todos os dados foram apresentados em média $\pm$ S.E.M. Foi considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

Os resultados desta tese serão apresentados em dois artigos originais que serão submetidos a periódicos com Qualis A1 – B1: Artigo original 1, intitulado “Resistance training during pregnancy affects maternal parameters and fetal growth in an intensity-dependent manner in rats” (APÊNDICE A); e Artigo original 2, intitulado: “Resistance training during pregnancy alters placental cell composition and nutrient transport impacting fetal growth in an intensity-dependent manner” (APÊNDICE B).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que reduzir a intensidade do treinamento na primeira semana de gestação de 80% para 50% da CCM, retornar à intensidade pré-gestacional na segunda semana de 50% para 80%, e reduzir novamente de 80% para 50% na terceira semana, variação que corresponde ao TIM, não promoveu alteração sobre parâmetros maternos avaliados ou sobre o crescimento fetal, no entanto, promoveu redução do percentual de sinciciotrofoblasto e aumento de capilares fetais com alteração na expressão do transportador de glicose (aumento de *Glut1*) na placenta. Quando a redução da intensidade do treinamento de 80% para 50% da CCM foi realizada apenas na terceira semana de gestação, variação que corresponde ao TID, também não observamos alterações nos parâmetros maternos, mas observamos uma redução no crescimento fetal com maior impacto sobre os fetos fêmeas sem alterar na composição celular da do labirinto ou a expressão de genes que influenciam a transferência de nutrientes, desenvolvimento e funcionalidade da placenta.

Interessantemente, não reduzir a intensidade do treinamento resistido durante a gestação, mantendo o percentual do período pré-gestacional, 80% CCM, que corresponde ao TIC, promoveu redução na glicose sérica das mães, não alterou o crescimento fetal, mas aumentou a expressão do transportador de glicose *Glut1* na placenta. Nossos dados também mostraram que a realização apenas do teste de capacidade de carregamento máximo sem treinamento resistido durante a gestação, reduziu a albumina sérica e o tamanho do adipócito materno, aumentou o número de fêmeas na ninhada, mas não alterou o crescimento fetal. Essas alterações foram acompanhadas por redução do percentual de sinciciotrofoblasto e aumento de capilares fetais e da expressão de mRNA de *Snat1* na placenta.

As repercussões maternas, placentárias e fetais que observamos dos diferentes programas de treinamento resistido podem representar ajustes metabólicos e a adaptabilidade da placenta na tentativa de garantir o melhor desfecho no crescimento fetal. Com base nas nossas observações, acreditamos que continuar com a mesma intensidade do treinamento resistido pré-gestacional, durante a gestação pode ser considerado seguro para o crescimento feto-placentário de ratas. Enquanto a variação em um TIM e a realização do teste de capacidade de carregamento máximo, promove adaptações metabólicas e placentárias que levanta a necessidade de investigar o custo da dessas adaptações para saúde da prole nas diferentes fases da vida, tendo em vista que na observação a curto prazo não houve prejuízo no crescimento fetal. Além disso, é relevante investigar outros mecanismos que possam estar envolvidos na redução do crescimento fetal. Nossos resultados ainda exaltam a importância de não se analisar

a área da zona do labirinto separadamente para compreender as modificações sobre o crescimento fetal, visto observamos alteração na composição celular da zona do labirinto sem que área do labirinto o crescimento fetal fosse alterado.

REFERÊNCIAS

- ACOG. Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period: ACOG Committee Opinion, Number 804. **Obstet Gynecol**, v. 135, n. 4, p. e178-e188, 2020.
- ADAMSON, S. L. et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev Biol**, v. 250, n. 2, p. 358-373, Oct 15 2002..
- AGUILERA, N. et al. Rodent models in placental research. Implications for fetal origins of adult disease. **Anim Reprod**, v. 19, n. 1, p. e20210134, 2022
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.
- ANSON-CARTWRIGHT, L. et al. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 311-314, Jul 2000..
- ANTONIO-SANTOS, J. et al. Resistance Training Alters the Proportion of Skeletal Muscle Fibers but Not Brain Neurotrophic Factors in Young Adult Rats. **J Strength Cond Res**, v. 30, n. 12, p. 3531-3538, Dec 2016.
- ARMANT, D. R.; WANG J FAU - LIU, Z.; LIU, Z. Intracellular signaling in the developing blastocyst as a consequence of the maternal-embryonic dialogue. **Semin Reprod Med**, v. 18, n. 3, p. 273-287, 2000.
- ASHKAR, A. A.; DI SANTO JP FAU - CROY, B. A.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 259-270, Jul 17 2000.
- BARAKAT, R.; LUCIA, A.; RUIZ, J. R. Resistance exercise training during pregnancy and newborn's birth size: a randomised controlled trial. **Int J Obes (Lond)**, v. 33, n. 9, p. 1048-1057, Sep 2009.
- BARAKAT, R. A.-O. et al. Does Exercise During Pregnancy Affect Placental Weight?: A Randomized Clinical Trial. **Eval Health Prof**, v. 41, n. 3, p. 400-414, Sep 2018.
- BARKER, M. et al. Translating Developmental Origins: Improving the Health of Women and Their Children Using a Sustainable Approach to Behaviour Change. **Healthcare (Basel)**, v. 5, n. 1, Mar 20 2017.
- BARNES, M. D. et al. Intersystem Implications of the Developmental Origins of Health and Disease: Advancing Health Promotion in the 21st Century. **Healthcare (Basel)**, v. 4, n. 3, Jul 15 2016.
- BASS, N. M. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. **Chem Phys Lipids**, v. 38, n. 1-2, p. 95-114, Aug 30 1985.

BAUMANN, M. U. et al. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by insulin-like growth factor I (IGF-I). **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e106037, 2014.

BAYOL, S. et al. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br J Nutr**, v. 91, n. 3, p. 331-339, Mar 2004.

BAZER, F. W.; WU, G.; JOHNSON, G. A. Pregnancy recognition signals in mammals: the roles of interferons and estrogens. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 1, p. 7-29, 2018.

BELL, A. W.; EHRHARDT, R. A. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. **Nutr Res Rev**, v. 15, n. 2, p. 211-230, Dec 2002.

BOGIN, B. The Evolution of Human Growth. In: BOGIN, B. (Ed.). **Patterns of Human Growth**. 3. Cambridge: Cambridge University Press, 2020. p.143-186. (Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology). ISBN 9781108434485.

BURKE, K. T. et al. Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster. **J Lipid Res**, v. 50, n. 6, p. 1146-1155, Jun 2009.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 370, n. 1663, p. 20140066, Mar 5 2015.

CAMERON, N.; DEMERATH, E. W. Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. **Am J Phys Anthropol**, v. Suppl 35, p. 159-184, 2002.

CARLSON, B. M. Chapter 14 - The Reproductive System. In: CARLSON, B. M. (Ed.). **The Human Body**: Academic Press, 2019. p.373-396. ISBN 978-0-12-804254-0.

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

CHAREST, P. L. et al. Histomorphologic Analysis of the Late-term Rat Fetus and Placenta. **Toxicol Pathol**, v. 46, n. 2, p. 158-168, Feb 2018.

CHRISTIANSEN-WEBER, T. A. et al. Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. **Am J Pathol**, v. 157, n. 3, p. 1017-1029, Sep 2000.

CLAPP, J. F. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 527-534, Jun-Jul 2006.

CLAPP, J. F., 3RD. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 110 Suppl 1, p. S80-85, Sep 22 2003.

CLAPP, J. F., 3RD et al. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 6, p. 1484-1488, Dec 2000a.

CLAPP, J. F., 3RD et al. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 142-147, Jan 2002.

CLAPP, J. F., 3RD; RIZK, K. H. Effect of recreational exercise on midtrimester placental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 167, n. 6, p. 1518-1521, Dec 1992.

CLAPP, J. F., 3RD et al. Portal vein blood flow-effects of pregnancy, gravity, and exercise. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 1, p. 167-172, Jul 2000.

COAN, P. M. et al. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. **J Physiol**, v. 586, n. 18, p. 4567-4576, Sep 15 2008.

COAN, P. M. et al. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. **Dev Dyn**, v. 235, n. 12, p. 3280-3294, Dec 2006.

COAN, P. M.; FERGUSON-SMITH AC FAU - BURTON, G. J.; BURTON, G. J. Ultrastructural changes in the interhaemal membrane and junctional zone of the murine chorioallantoic placenta across gestation. **J Anat**, v. 207, n. 6, p. 783-796, Dec 2005.

CONSTÂNCIA, M. et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 52, p. 19219-19224, 2005/12/27 2005.

CONSTANCIA, M. et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 945-948, Jun 27 2002.

CONTARTEZE, R. V. L. et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 151, n. 3, p. 415-422, Nov 2008.

D RESENDE et al. Exercise-training reduced blood pressure and improve placental vascularization in pregnant spontaneously hypertensive rats--pilot study. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 31, n. 6, p. 423-431, Dec 2012.

DANIEL, Z. et al. The effect of maternal undernutrition on the rat placental transcriptome: protein restriction up-regulates cholesterol transport. **Genes & Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 27, 2016/10/12 2016.

DAS, U. G. et al. Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2, p. R339-347, Feb 1998.

DE BARROS, M. C. et al. Resistance exercise and glycemic control in women with gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n. 6, p. 22, 2010.

DENNIS, P. B. et al. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1102-1105, Nov 2 2001.

DEVASKAR, S. U.; CHU, A. Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer. **Physiology (Bethesda)**, v. 31, n. 2, p. 131-146, Mar 2016.

DIXON, D. et al. Chapter 27 - Oviduct, Uterus, and Vagina. In: SUTTIE, A. W. (Ed.). **Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2018. p.537-559. ISBN 978-0-12-391448-4.

EL-HASHASH, A. H.; WARBURTON D FAU - KIMBER, S. J.; KIMBER, S. J. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. **Mech Dev**, v. 127, n. 1-2, p. 1-20, Jan-Feb 2010.

FRIAS, A. E. et al. Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2456-2464, 2011.

FUJITA, K. et al. Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors. **Placenta**, v. 32, n. 10, p. 737-744, Oct 2011.

FURUKAWA, S. et al. Toxicological pathology in the rat placenta. **J Toxicol Pathol**, v. 24, n. 2, p. 95-111, Jun 2011.

FURUKAWA, S.; TSUJI, N.; SUGIYAMA, A. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. **J Toxicol Pathol**, v. 32, n. 1, p. 1-17, Jan 2019.

GABRIEL, H. D. et al. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. **J Cell Biol**, v. 140, n. 6, p. 1453-1461, Mar 23 1998.

GANGULY, A.; COLLIS L FAU - DEVASKAR, S. U.; DEVASKAR, S. U. Placental glucose and amino acid transport in calorie-restricted wild-type and Glut3 null heterozygous mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3995-4007, Aug 2012.

GARCÉS, M. F. et al. Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 81, n. 1, p. 141-151, Jul 2014.

GARNÆS, K. K. et al. Effect of supervised exercise training during pregnancy on neonatal and maternal outcomes among overweight and obese women. Secondary analyses of the ETIP trial: A randomised controlled trial. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173937, 2017.

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

GOULD, S. et al. Resistance Training Does Not Decrease Placental Blood Flow During Valsalva Maneuver: A Novel Use of 3D Doppler Power Flow Ultrasonography. **Sports Health**, v. 13, n. 5, p. 476-481, Sep-Oct 2021.

GRIGSBY, P. L. Animal Models to Study Placental Development and Function throughout Normal and Dysfunctional Human Pregnancy. **Semin Reprod Med**, v. 34, n. 1, p. 11-16, Jan 2016.

HAN, V. K. et al. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 7, p. 2680-2693, Jul 1996.

HARDY, D. B. et al. Exercise in Pregnancy Increases Placental Angiogenin without Changes in Oxidative or Endoplasmic Reticulum Stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 53, n. 9, 2021.

HARDY, K. Chapter Three - Embryology. In: BENNETT, P. e WILLIAMSON, C. (Ed.). **Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (Fourth Edition)**: Churchill Livingstone, 2010. p.25-47. ISBN 978-0-443-10281-3.

HAYWARD, C. E.; JONES, R. L.; SIBLEY, C. P. J. P. I. E. Mechanisms of transfer across the human placenta. **Placenta Intrauterine Environment**, v. 12, p. 121-133, 2008.

HERINGTON, J. L.; BANY, B. M. Effect of the Conceptus on Uterine Natural Killer Cell Numbers and Function in the Mouse Uterus During Decidualization1. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, p. 579-588, 2007a.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

HU, D.; CROSS, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **Int J Dev Biol**, v. 54, n. 2-3, p. 341-354, 2010.

IBRAHIMI, A. et al. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 7, p. 2646-2651, Apr 2 1996.

INAGAKI, M. et al. Contribution of Prostaglandin Transporter OATP2A1/SLCO2A1 to Placenta-to-Maternal Hormone Signaling and Labor Induction. **iScience**, v. 23, n. 5, p. 101098, May 22 2020.

JACKSON, M. R. et al. The effects of maternal aerobic exercise on human placental development: placental volumetric composition and surface areas. **Placenta**, v. 16, n. 2, p. 179-191, Mar 1995.

JANSSON, N. et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. **J Physiol**, v. 576, n. Pt 3, p. 935-946, Nov 1 2006.

JULIO-PIEPER, M. et al. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 57, Nov 10 2006.

KANAI-AZUMA, M. et al. Nerve growth factor promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 231, n. 2, p. 309-315, Feb 13 1997.

KENNEDY, T. G. Decidualization. In: HENRY, H. L. e NORMAN, A. W. (Ed.). **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.379-385. ISBN 978-0-12-341103-7.

KNIPP, G. T. et al. Fatty acid transport regulatory proteins in the developing rat placenta and in trophoblast cell culture models. **Placenta**, v. 21, n. 4, p. 367-375, May 2000.

KONSTANTAKOU, P. et al. Dysregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: implications during pregnancy and beyond. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 30, n. 3, p. 284-293, Feb 2017.

KRAEMER, R.; HEMPSTEAD, B. L. Neurotrophins: novel mediators of angiogenesis. **Front Biosci**, v. 8, p. s1181-1186, Sep 1 2003.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 4, p. 674-688, Apr 2004.

KUCUK, M.; DOYMAZ, F. Placental weight and placental weight-to-birth weight ratio are increased in diet- and exercise-treated gestational diabetes mellitus subjects but not in subjects with one abnormal value on 100-g oral glucose tolerance test. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 23, n. 1, p. 25-31, 2009/01/01/ 2009.

KULKARNI, S. R. et al. Maternal lipids are as important as glucose for fetal growth: findings from the Pune Maternal Nutrition Study. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2706-2713, Sep 2013.

KWON, E. J.; KIM, Y. A.-O. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstet Gynecol Sci**, v. 60, n. 6, p. 506-519, Nov 2017a.

KWON, E. J.; KIM, Y. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstet Gynecol Sci**, v. 60, n. 6, p. 506-519, 2017b.

LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. **J Pregnancy**, v. 2012, p. 179827, 2012.

LASH, G. E. et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 3, p. 572-580, Sep 2006.

LIANG, Y.-X. et al. The high concentration of progesterone is harmful for endometrial receptivity and decidualization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 712, 2018/01/15 2018.

LINDEGAARD, M. L. et al. Characterization of placental cholesterol transport: ABCA1 is a potential target for in utero therapy of Smith-Lemli-Opitz syndrome. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 23, p. 3806-3813, Dec 1 2008.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-1408, Mar 2008.

MANGWIRO, Y. T. et al. Maternal exercise alters rat fetoplacental stress response: Minimal effects of maternal growth restriction and high-fat feeding. **Placenta**, v. 104, p. 57-70, Jan 15 2021.

MANGWIRO, Y. T. M. et al. Exercise initiated during pregnancy in rats born growth restricted alters placental mTOR and nutrient transporter expression. **J Physiol**, v. 597, n. 7, p. 1905-1918, Apr 2019.

MANGWIRO, Y. T. M. et al. Maternal exercise in rats upregulates the placental insulin-like growth factor system with diet- and sex-specific responses: minimal effects in mothers born growth restricted. **J Physiol**, v. 596, n. 23, p. 5947-5964, Dec 2018.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, Nov 2002.

MEIRELES, A. L. F. et al. Maternal resistance exercise promotes changes in neuroplastic and epigenetic marks of offspring's hippocampus during adult life. **Physiology & Behavior**, v. 230, p. 113306, 2021/03/01/ 2021a.

MEIRELES, A. L. F. et al. Strength training during pregnancy influences hippocampal plasticity but not body development in neonatal rats. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 21, n. 2, p. 279-286, 2021b.

MEIRELES, A. L. F. et al. Strength training during pregnancy influences hippocampal plasticity but not body development in neonatal rats. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 21, n. 2, p. 279-286, Jun 1 2021c.

MISHIMA, T. et al. The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25865, 2011.

MONK, C.; LUGO-CANDELAS, C.; TRUMPFF, C. Prenatal Developmental Origins of Future Psychopathology: Mechanisms and Pathways. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 15, p. 317-344, May 7 2019.

MOTTOLA, M. F. et al. Cellular accumulation of heat shock protein (Hsp) 72i in fetuses of trained rats. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 2, p. 101-105, Summer 2007.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **J Physiol**, v. 572, n. Pt 1, p. 25-30, Apr 1 2006.

NAPSO, T. et al. Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 16916, Nov 28 2019.

NAYAK, N. R.; GIUDICE, L. C. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. **Placenta**, v. 24, n. 4, p. 281-296, Apr 2003.

NG, S. W. et al. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 11, Jun 8 2020..

NÜSKEN, E. et al. Increased Rat Placental Fatty Acid, but Decreased Amino Acid and Glucose Transporters Potentially Modify Intrauterine Programming. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 7, p. 1594-1603, Jul 2016.

OKADA, H. A.-O.; TSUZUKI, T.; MURATA, H. Decidualization of the human endometrium. **Reprod Med Biol**, v. 17, n. 3, p. 220-227, Jul 2018.

ONODA, A. et al. Effects of Maternal Exposure to Ultrafine Carbon Black on Brain Perivascular Macrophages and Surrounding Astrocytes in Offspring Mice. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94336, 2014.

PRICE, B. B.; AMINI SB FAU - KAPPELER, K.; KAPPELER, K. Exercise in pregnancy: effect on fitness and obstetric outcomes-a randomized trial. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 12, p. 2263-2269, Dec 2012.

RAI, A.; CROSS, J. C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. **Developmental Biology**, v. 387, n. 2, p. 131-141, 2014/03/15/ 2014.

RAMATHAL, C. Y. et al. Endometrial decidualization: of mice and men. **Semin Reprod Med**, v. 28, n. 1, p. 17-26, Jan 2010.

RAMÍREZ-VÉLEZ, R. et al. Effect of exercise training on eNOS expression, NO production and oxygen metabolism in human placenta. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80225, 2013.

RENAUD, S. J. Chapter 66 - Strategies for Investigating Hemochorial Placentation. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)**: Academic Press, 2017. p.1259-1273. ISBN 978-0-12-804239-7.

ROOS, S. et al. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. **J Physiol**, v. 582, n. Pt 1, p. 449-459, Jul 1 2007.

ROSA, B. V. et al. Voluntary exercise in pregnant rats positively influences fetal growth without initiating a maternal physiological stress response. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 5, p. R1134-1141, May 2011.

ROSARIO, F. J. et al. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. **Endocrinology**, v. 152, n. 3, p. 1119-1129, Mar 2011.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: Lessons from mouse mutants. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 7, p. 538-548, 2001/07/01 2001.

ROUMANILLE, R. et al. Acute and chronic effects of Rhaponticum carthamoides and Rhodiola rosea extracts supplementation coupled to resistance exercise on muscle protein

synthesis and mechanical power in rats. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 17, n. 1, p. 58, Nov 16 2020.

ROWELL, L. B. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. **Physiol Rev**, v. 54, n. 1, p. 75-159, Jan 1974.

SAHAY, A. S.; SUNDRANI, D. P.; JOSHI, S. R. Neurotrophins: Role in Placental Growth and Development. **Vitam Horm**, v. 104, p. 243-261, 2017.

SALTIN, B.; ROWELL, L. B. Functional adaptations to physical activity and inactivity. **Fed Proc**, v. 39, n. 5, p. 1506-1513, Apr 1980.

SANCHES, A. P. V. et al. Obesity phenotype induced by high-fat diet leads to maternal-fetal constraint, placental inefficiency, and fetal growth restriction in mice. **J Nutr Biochem**, v. 104, p. 108977, Jun 2022.

SBC. Posicionamento sobre Exercícios Físicos na Gestação e no Pós-Parto – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2021/5// 2021.

SENEVIRATNE, S. N. et al. Effects of antenatal exercise in overweight and obese pregnant women on maternal and perinatal outcomes: a randomised controlled trial. **Bjog**, v. 123, n. 4, p. 588-597, Mar 2015.

SFERRUZZI-PERRI, A. A.-O. et al. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. **J Physiol**, v. 595, n. 15, p. 5057-5093, Aug 1 2017.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 1, p. 7-20, Jan 1 2011.

SHARKEY, A. M.; SMITH, S. K. The endometrium as a cause of implantation failure. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 2, p. 289-307, Apr 2003.

SHIN, B. C. et al. Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. **Endocrinology**, v. 138, n. 9, p. 3997-4004, Sep 1997.

SIBILIA, M.; WAGNER, E. F. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. **Science**, v. 269, n. 5221, p. 234-238, Jul 14 1995.

SILVA, J. F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell Adh Migr**, v. 10, n. 1-2, p. 88-110, Mar 3 2016.

SIMMONS, D. G. 12 - Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. In: CROY, B. A.; YAMADA, A. T., *et al* (Ed.). **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Boston: Academic Press, 2014. p.143-161. ISBN 978-0-12-394445-0.

SIMMONS, D. G. et al. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. **Development**, v. 135, n. 12, p. 2083-2091, Jun 2008.

SON, J. A.-O. X. et al. Exercise prevents the adverse effects of maternal obesity on placental vascularization and fetal growth. **J Physiol**, v. 597, n. 13, p. 3333-3347, Jul 2019.

SUTHERLAND, A. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. **Dev Biol**, v. 258, n. 2, p. 241-251, Jun 15 2003.

TAKAHASHI, Y. et al. Contributions of system A subtypes to α -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. **Amino Acids**, v. 49, n. 4, p. 795-803, Apr 2017.

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B.-C. Ultrastructure of the Rodent Placental Labyrinth: A Site of Barrier and Transport. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 1, p. 13-24, 1997.

TAKATA, K.; HIRANO, H. Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. **Microsc Res Tech**, v. 38, n. 1-2, p. 145-152, Jul 1-15 1997.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85-96, 2006/02/01 2006.

TAYADE, C. et al. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4267-4275, Apr 1 2007.

TUNG HN FAU - PARR, M. B.; PARR, E. L. The permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: an ultrastructural tracer and freeze-fracture study. **Biol Reprod**, v. 35, n. 4, p. 1045-1058, Nov 1986.

TUNSTER, S. J. et al. Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. **Reproduction**, v. 159, n. 6, p. R213-r235, Jun 2020.

UENO, M. et al. c-Met-dependent multipotent labyrinth trophoblast progenitors establish placental exchange interface. **Dev Cell**, v. 27, n. 4, p. 373-386, Nov 25 2013.

VAUGHAN, O. R. et al. Corticosterone alters materno-fetal glucose partitioning and insulin signalling in pregnant mice. **J Physiol**, v. 593, n. 5, p. 1307-1321, Mar 1 2015.

VOLPATO, G. T. et al. Oxidative stress status and placental implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. **Reprod Sci**, v. 22, n. 5, p. 602-608, May 2015.

WANG, C. et al. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. **Cell Tissue Res**, v. 300, n. 2, p. 285-293, May 2000.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 180-193, Jun 2005.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102 Suppl 1, p. 6543-6549, May 03 2005.

WINTERHAGER, E.; GELLHAUS, A. Transplacental Nutrient Transport Mechanisms of Intrauterine Growth Restriction in Rodent Models and Humans. **Front Physiol**, v. 8, p. 951, 2017.

WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 570, 2018.

WU, L. et al. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 942-947, Feb 27 2003.

WYRWOLL, C. S.; SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Altered placental function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 knockout mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1287-1293, Mar 2009.

YUAN, J. et al. Primary decidual zone formation requires Scribble for pregnancy success in mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5425, 2019/11/28 2019.

YUNG, H. W. et al. Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. **J Pathol**, v. 228, n. 4, p. 554-564, Dec 2012.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL 1

Title: Resistance training during pregnancy affects maternal parameters and fetal growth in an intensity-dependent manner in rats

Abstract

This study investigated the effects of different intensities of resistance training during pregnancy on maternal biochemical profile and reproductive performance, and fetal growth. Thirty-five female Wistar rats were used. Maximum load tests (MLT) were performed weekly to evaluate maximum load capacity (MLC). Resistance training (RT) consisted of climbing a ladder 5 sessions/week. Before pregnancy, RT was performed at 80% of MLC for 3-weeks. During pregnancy, RT intensity varied: Constant intensity (CIT) group trained at 80% of MLC through gestation; Decreasing intensity (DIT) group trained at 80% of MLC at first and second weeks of gestation and at 50% of MLC at third week; Variable intensity (VIT) group trained at 50% of MLC during first and third weeks, and at 80% of MLC at second week. Control group never trained, and Maximum load (ML) group only performed the MLT weekly. No differences were observed in maternal body weight, food consumption or muscular glycogen content. At 20th gestational day, dams from CIT had reduced serum glucose, while DIT promoted lower fetal weight. In addition, ML group had lower serum albumin and reduction in adipocyte size and greater number of female fetuses. In conclusion, maintain the intensity of the RT equal to pre-pregnancy period or reducing it in the first and third week of pregnancy does not promote significant changes in maternal and fetal parameters when compared to non-exercise rats and those that only performed the MLT, while the reduction of the intensity only in the third week of pregnancy seems to negatively influence growth of female fetuses.

KEYWORDS: gestation; strength training; fetal growth; reproductive parameters; biochemical profile

Introduction

Pregnancy is characterized by significant maternal, metabolic, and physiological modifications in response to the demand of the developing fetus (SOMA-PILLAY *et al.*, 2016). Maternal lifestyle can modulate these changes and impacts maternal health and fetal growth

and development (GAILLARD, WRIGHT e JADDOE, 2019). Physical exercise during pregnancy can reduce the incidence of pregnancy complications, as gestational diabetes mellitus and excessive gestational weight gain and can reduce the risk of metabolic disease in offspring (REYES e DAVENPORT, 2018; SON *et al.*, 2019; DIPLA *et al.*, 2021).

However, some studies point out that maternal and fetal outcomes are dependent of the type, frequency, and intensity of exercise as well as gestational period when it is performed and maternal fitness level prior pregnancy (CLAPP *et al.*, 2000; CLAPP *et al.*, 2002). In human, moderate intensity weight-bearing exercise (55-60% $\text{VO}_{2\text{max}}$) in early pregnancy increased fetal growth (CLAPP *et al.*, 2000), whereas high volume of weight-bearing exercise in the second and third gestational trimester, reduced fetal growth (CLAPP *et al.*, 2002). In rats, strength training (vertical ladder climbing) (3 times per week/35–75% of maximum load capacity) during pregnancy did not alter physical development of male offspring but showed transitory changes in body weight and skull axis (MEIRELES *et al.*, 2021a). In another study, also with rats, swimming program (6 times per week/40 min per day) reduced fetal weight (SOARES *et al.*, 2021).

Guidelines recommend that, in the absence of obstetric or medical complications or contraindications, pregnant women should be encouraged to initiate aerobic and resistance exercises or muscle-strengthening in moderate intensity (PIERCY *et al.*, 2018; ACOG, 2020). It is recommended that the exercise started after 12 weeks of gestation to a safe and effective exercise program (ACOG, 2020) and, when the woman was previously sedentary or inactive, she should gradually increase the amount of physical activity (PIERCY *et al.*, 2018). Women who were physically active before pregnancy can continue aerobic exercises during pregnancy including vigorous-intensity ones (PIERCY *et al.*, 2018; ACOG, 2020), but for resistance training (RT), even elite athletes, for example, should reduce the load compared with prepregnant conditions. As RT is not considered as a safe activity due to a possible fetal heart deceleration promoted by Valsalva maneuvers (ACOG, 2020). In another guideline for pregnant women, weightlifting and intense repetitive isometric exercise were not advised due to the lack of research and limited information about safety (BROWN *et al.*, 2020).

These recommendations are cautious and justified by insufficient evidence on outcomes of the RT on maternal and fetal health, as well as the intensity of resistance exercises at different periods of pregnancy. Therefore, we tested the hypothesis that RT during pregnancy in previously active rats impacts maternal body weight gain, food intake, adiposity, serum biochemical profile and fetal growth in an intensity-dependent manner.

2. Materials and Methods

2.1. Animals caring and experimental groups

Thirty-five virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighted 180-220g, aged 60-70 days were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. Animals were maintained in a controlled environment ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) on 12:12h light-dark cycle (dark 08:00 AM – 08:00 PM) and food and water were freely available. All experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco (Protocol number: 0059/2018) and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Rats were acclimatized for 5 days in the vivarium and then randomly assigned to five experimental groups defined by manipulation before and during pregnancy. Control group (C, $n=7$) did not undergo any test or resistance training. Maximum Load group (ML, $n=6$) only performed maximum load tests weekly before and during pregnancy and was used as a control from the influence of maximal test. All trained groups performed the same resistance training before pregnancy, but they have trained at different intensities during pregnancy: Constant-Intensity trained group (CIT, $n= 8$), Variable-Intensity trained group (VIT, $n= 7$), Decreasing-Intensity trained group (DIT= 7). Females from Control and Maximum Load groups were also manipulated daily and stayed in the room from RT to mimic any stress that the environment could cause in the trained groups.

Females were mated at a ratio of 1 male to 1 female and the day when spermatozoa were visualized in the vaginal smear was registered as gestational day 0 (G0). All females were killed by decapitation at G20.

2.2. Apparatus adaptation and Maximum load test

The resistance training apparatus consisted of a vertical ladder (1.32 x 0.2 m) with an inclination of 70° as described by (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016) (Fig. 1). The load apparatus (cylindrical plastic container 5 x 10.5 cm) was fixed to the tail proximal portion by adhesive tape and weight steel were used as load. For one week, all female rats from ML and all trained groups were familiarized with the ladder and the load apparatus as described previously (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016) with the following differences: on the fifth day, the climbs were performed with a load of 10% of body weight (BW), and the interval between climbs was 40 seconds from first to third day and 50 seconds on fourth and fifth day.

Twenty-four hours after the end of adaptation and weekly during pre-pregnancy and pregnancy period, the rats from ML and all trained groups performed the Maximum Load Test (MLT). At the first MLT, initial load was 75% of the animal's BW. After each successful climb 30 g was added to the load apparatus. A failure was considered when the animal could not climb the ladder in 2 successive attempts. Maximum Load Carried (MLC) was considered the highest load reached in the last successful climb. For the MLT at the subsequent weeks, the load of the first two climbs was 80% and 100% of the previous MLC, respectively, and 30 g were added at the other climbs until failure. There was always 120 seconds of rest between climbs. Relative load was calculated by the formula: $RL = \text{maximum load carried (g)} / \text{body weight (g)}$. Weekly increment in load capacity was calculated as a percentage of the initial MLC by the formula: $\%IMLC = (\text{maximum load carried at the test (g)} * 100 / \text{maximum load carried at first test (g)}) - 100$. For the gestational period, the first test was considered the one performed before mating.

2.3. Resistance training protocol

Before pregnancy, all rats in trained groups (CIT, VIT, and DIT) performed three weeks of RT in ladder, 5 sessions/week, 8-9 climbs per session, with 90 seconds of rest between climbs, at 80% of the week MLC. During pregnancy, from G1 to G19, training intensity differed among trained groups, but all the other parameters of training remained the same. CIT group did not change load intensity compared to pregestational period, they trained at 80% of MLC during all weeks of pregnancy. DIT group decreased load intensity only at the final week of gestation, they trained at 80% of MLC at the first and second gestational week and 50% at the third one. VIT group reduced load at the beginning and at the end of gestation, they trained at 50% of MLC at the first and third weeks of pregnancy and at 80% of MLC at the second week. The load of resistance training programs before and during pregnancy were adjusted weekly by the result in MLT. All MLT and training protocols were conducted in dark phase of the cycle (1:00PM- 5:00PM).

Training Work ($TW = (MLC + BW) \times g \times \Delta h \times N$) and Performance ($Pi = TW / \text{climbing time}$) were calculated for each week of RT (PHILIPPE *et al.*, 2019). MLC and BW were considered in kilogram, g was the constant of the earth's gravity in m/s^2 , Δh was the distance climbed by the animals in meters, N was the daily mean number of climbs and climbing time was the daily mean time of climb in seconds, TW in Joules, and Pi in Watts.

2.4. Body weight and food intake assessments

Body weight was recorded weekly throughout all the experimental periods. Percentage of body weight gain (%BWG) from each period was calculated by the formula: $\%BWG = \frac{[\text{final body weight (g)} \times 100 / \text{initial weight (g)}] - 100}{100}$ (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Maternal food consumption was determined weekly during pregnancy by the difference between food offered and food rejected. Maternal feed efficiency (FE) was calculated: $FE = \frac{\text{body weight at G20 (g)} - \text{body weight at G1 (g)}}{\text{total food intake in the period}}$ (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019).

2.5. Samples collection

At G20, 24h after the last training session and with six hours of fasting, the females' rats were killed by decapitation and blood samples were collected from the trunk to obtain the serum. The serum was stored at -80° until analyses. Immediately after decapitation, abdominal region was opened, and the uterus removed. All fetuses were counted and removed for body weight assessment. Uterus was searched for fetal resorption sites. The abdominal white adipose (aWAT) and maternal soleus were collected for histomorphometric analysis. aWAT was fixed in 10% formalin and the soleus muscles were frozen immediately in ice-cooled isopentane and stored at -80°C until analysis.

2.6. Reproductive performance and fetal growth assessment

The sex of the fetus was determined by the anogenital distance. Fetal growth was assessed by body weight and fetal growth index that was calculated by the formula: $\text{fetal weight (g)} / \text{pregnancy weight gain (g)}$ (SANCHES *et al.*, 2022). A digital balance was used to measure the body weight.

2.7. Biochemical parameters assessment

Determination of serum albumin, total cholesterol, glucose, and triglycerides concentrations were performed using respective Labtest ®Kits (MG/Brazil) according to manufacturer instructions.

2.8. Histological analyses

Fixed aWAT were dehydrated in increasing concentration of ethanol, cleared in xylene, embedded in paraffin, and sectioned in microtome (Leica RM 2255) at $4\mu\text{m}$. After that, the sections were deparaffinized and rehydrated and submitted to hematoxylin-eosin (HE) staining.

The images of sections were obtained by microscope Olympus BX50 (40X objective) attached to the camera and Leica LA EZ software used for image collection. To quantify adipocyte size of the aWAT, the stained sections were measured in Image J using the free hand tool to encircle individual adipocyte from 20 images. The area and perimeter of adipocyte were determined by analysing 100 adipocyte per animal. The frozen soleus muscle was embedded in OCT compound (Fisher Healthcare™ Tissue-Plus™) and sectioned transversely at 8µm using cryostat (SLEE MNT) to periodic acid Schiff (PAS) staining for detection of muscle glycogen. Briefly, the sections were hydrated to water for 2 minutes and then incubated in 0.5% periodic acid solution for 45 minutes. Next, the sections were washed in distilled water and after that were incubated for 60 minutes in Schiff's reagent and washed in running water for 5 minutes. Finally, sections were immersed for 20 minutes in Harris's hematoxylin to stain cell nuclei. Then, sections were washed again in running water to remove excess of stain and after drying, were mounted using Entellan New. In soleus muscle, morphometric analyses were considered the count of a total of 1100 intersections points per animal using cell count plugin of Image J (NIH, USA).

2.9. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate data normality. Data from maternal percentage of weight gain, biochemical parameters, total food intake, number of fetuses and percentage of muscular glycogen were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. All data of the maternal evolution of body weight, weekly food intake, maximum load tests, and all resistance training measurements were analyzed by repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Data from area and perimeter of the adipocyte are analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test. The significant level was considered at $p < 0.05$ in all cases. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism7.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1 Maximum load test (MLT) parameters

Before pregnancy, at the second MLT, animals from CIT and VIT groups carried higher relative load compared to ML group ($P < 0.01$), while in the third and fourth MLT, all trained groups carried higher relative load than ML group ($P < 0.0001$) (Fig. 2A). Regarding percentage

of increment in maximum load carrying capacity (%IMLC) in pre-pregnancy period, rats from CIT, DIT and VIT groups obtained higher increment in their load capacity in the third and fourth MLT compared with the rats of the ML group ($P<0.01$) (Fig. 2B). For both MLT performed during pregnancy period, relative load of all trained groups was higher compared to ML group (1st MLT, $P<0.001$; 2nd MLT, $P<0.0001$) (Fig. 2C). However, no difference was observed among the groups for %IMLC (Fig. 2D).

3.2. Resistance training parameters

Before pregnancy, no differences among trained groups were observed in weekly training work (TW) nor in physical performance (Fig. 3A-B). However, during pregnancy, animals of CIT and DIT group had higher TW than animals of VIT group in the first week, and animals of CIT group had higher TW than animals of DIT and VIT on the third week (First week: $P<0.001$; Third week: $P<0.0001$) (Fig. 3C). Physical performance during pregnancy was not different among the trained groups (Fig. 3D).

3.3. Maternal body weight and food intake

There was no significant difference in the evolution of body weight or the percentage of weight gain among the groups in pre-pregnancy period (Fig. 4A-B). However, during gestational period, rats from DIT group were lighter than the rats from ML group, at G14 ($P<0.05$) (Fig. 4C) and at G20, CIT and DIT groups were also lighter than animals from ML group ($P<0.05$) (Fig. 4C). No difference was observed among groups in the %BWG, weekly food consumption, total food intake and feed efficiency during pregnancy (Fig. 4D and Fig. 5A-C).

3.4. Reproductive performance and fetal growth parameters.

No differences were observed in fetal resorption rates or fetal growth index among the experimental groups (Table 1). ML group had higher number of female fetuses than C, CIT, and DIT groups ($P<0.05$ vs. C and CIT; $P<0.01$ vs. DIT) (Table 1). Regarding fetal weight, male and female fetus from DIT group were lighter than their respective pairs in CIT and C group, respectively (male: $P<0.05$ vs. CIT; female: $P<0.05$ vs. C) (Table 1).

3.4. Maternal biochemical parameters

Pregnant rats from CIT group had higher serum glucose levels than dams from C and DIT groups ($P < 0.05$) (Table 2). Serum triglyceride levels were higher in pregnant rats from VIT group compared to CIT and ML groups ($P < 0.05$) (Table 2). Serum albumin level from ML group was lower than all other groups ($P < 0.05$) (Table 2). No differences were observed in serum total cholesterol levels among the experimental groups (Table 2).

Significant reduction in area and perimeter of maternal adipocyte were observed in the ML group compared to C, CIT, and VIT group (Area, $P < 0.05$ vs. C and CIT; $P < 0.0001$ vs. VIT; Perimeter, $P < 0.001$ vs. C; $P < 0.05$ vs. CIT; $P < 0.0001$ vs. VIT). While animals of the VIT group showed an increase in the perimeter of maternal adipocyte compared to DIT group ($P < 0.05$) (Fig. 6). There was no difference in muscle glycogen percentage (Fig. 7).

4.0. Discussion

The present study demonstrated that different protocols of resistance training (RT) during pregnancy period promotes progressive increase in maximum load carrying capacity and that the manipulation of RT load during pregnancy alters body weight, serum glucose and triglycerides levels and fetal weight. In addition, even the performance of a weekly maximum load test (MLT) affected the serum albumin levels, adipocyte size and fetal sex ratio.

Before pregnancy, females from all trained groups showed similar results with higher increment in maximum load carrying capacity (IMLC), relative load in MLTs and progressive increase of training work and performance compared. These results were expected considering that in pre-pregnancy period, the RT program was the same for all trained groups. But these findings are important because they are consistent with other studies using similar model of RT which showed increased maximum load capacity (HORNBERGER e FARRAR, 2004; ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; AHTIAINEN *et al.*, 2018), progressive increase of performance and training work (PHILIPPE *et al.*, 2019) and strength gain (AHTIAINEN *et al.*; ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016) in response to RT in males. The increase in maximum load carrying capacity observed in our study at the beginning of resistance training program can be attributed to neural and morphological adaptations of skeletal muscle (CARROLL, RIEK e CARSON, 2001), as result of alteration in synaptic efficacy that increases motor unit synchrony and improve muscular coordination, reducing antagonist muscle activation and/or alterations of metabolism of muscle fibers (CARROLL, RIEK e CARSON, 2001). These adaptations

would influence the manner that muscles trained are recruited to perform tasks, in our exercise model, on the climbs.

During the pregnancy period, pregnant rats from trained groups still had higher relative load than untrained pregnant rats. Regarding their increment in load capacity, although it was slightly increased over the weeks, it was not different from untrained group. These results further reinforce the indicative of neural and morphological adaptations in skeletal muscle caused by RT. Considering both pre-pregnancy and pregnancy periods, our resistance training programs lasted 6 weeks and the reduced increasing in %IMLC was observed during the pregnancy. This result can be explained by two mechanism, first there is a stabilization of load training capacity that have already been observed in RT program for male rats (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016). The second one is related to a natural reduction in physical activity performed by pregnant rats during pregnancy that was showed by other studies (SANTANA MUNIZ *et al.*, 2014; FRAGOSO *et al.*, 2017). This later evidence is supported by finding that demonstrated that prolactin secretion during pregnancy is related to the suppression of voluntary physical activity (LADYMAN *et al.*, 2021). Although our rats had to perform the RT during the week, we can consider that, at the maximum load test, the animals were able to choose to continue or not climbing the ladder as they were free to release the ladder if they were not able to keep climbing it.

Regarding the training work during pregnancy, the difference observed among groups are due to the manipulation of the percentage of load used at each week. This is important as its show that the protocol presented here for the first for pregnant rats really modulates the worked performed during gestation. This allows the study of the consequences of variation of RT load, as suggested by some guidelines (PIERCY *et al.*, 2018; AOCG, 2020), on maternal and fetal parameters. Concerning the performance values, the lack of difference among trained groups, even though they had different training work, is due to the modulations of climb velocity performed by the pregnant rats considering the load carried and they increased body weight through gestation.

Body weight did not differ among groups before pregnancy, however, during pregnancy period, rats that trained with the highest load at the first and second weeks of pregnancy had lower body weight at G20. In other studies, pregnant rats that performed high intensity (85-90% $\text{VO}_{2\text{máx}}$) (SONGSTAD *et al.*, 2015) or moderate-low intensity training (65-30% $\text{VO}_{2\text{máx}}$) in treadmill, 5 days/week, did not changed their body weight (FIDALGO *et al.*, 2013). Differences in intensities and type of exercise between these studies and our study could justify

the disparity in results. Reduced body weight observed in our study, may be related to the fact that, after RT session, the metabolic rate remains high in relation to rest values (BØRSHEIM e BAHR, 2003). This moment is termed excess post-exercise oxygen (EPOC) that can occur by different factors, as energy substrate resynthesis, increase catecholamine levels and it been specially influenced by high intensity exercise (BØRSHEIM e BAHR, 2003). A previous study with female mice demonstrated that voluntary running promoted significant increase in oxygen consumption in EPOC during the light period (BROWN, NAPLES e BOOTH, 2012). In our study, the predominance of elevated intensity in the CIT and DIT group may have promoted increased EPOC during pregnancy and thus contributed to lower body weight observed.

The variation in RT program during pregnancy promoted differences in serum biochemical profile. Rats from CIT group showed lower glucose level compared with the VIT group. During pregnancy, increase insulin secretion and decrease insulin sensitivity are metabolic adaptations that occur to support fetal growth (HADDEN e MCLAUGHLIN, 2009). In rodents, the glucose levels rise until G10 and then decrease towards the end of gestation (WUYTS *et al.*, 2021). We believe that high intensity training (80% of MLC) in the third week of pregnancy may have affected glucose level in CIT pregnant rats. In a matter of fact, in resistance exercise, glucose is an important energy source for contracting skeletal muscle (RICHTER e HARGREAVES, 2013). Although this glucose reduction presented in CIT group pregnant rats was not accompanied by any other change in fetal outcome, this result is important because it indicates the possibility to use this regime of RT as a countermeasure to models that course with hyperglycemia, as during gestational diabetes.

In the present study, increased serum triglycerides level was observed in rats from VIT group, which performed resistance training at 50% of MLC at first and third weeks of pregnancy. This increasing in triglycerides levels observed here may be important to fetal growth and development. Firstly, during the late pregnancy, a switch to catabolic condition occurs with accelerated breakdown of fat deposits that normally promotes increased triglycerides level (ZENG, LIU e LI, 2017). Secondly, although triglyceride does not directly cross the placental barrier, it can be rapidly used by the other maternal tissues, during maternal fasting conditions, thus contributing to spares glucose for the fetus (HERRERA, 2000). Another mechanism able to benefit the offspring growth is hypertriglyceridemia contribution to milk synthesis around parturition through the increase in lipoprotein lipase levels in mammary gland in response to endocrine mechanisms as prolactin and insulin release that facilitates the clearance of circulating triglycerides for milk synthesis (HERRERA, 2000). Interestingly, in a

model of swimming exercise (80% of maximal load supported) for pregnant rats it was observed reduced triglycerides level in exercised group (LAZO-OSÓRIO *et al.*, 2009). It is important to note that swimming exercise can be stressful to rodents (JANG *et al.*, 2018) and this reduction in triglycerides in this model may indicate some impairment to fetal and postnatal development.

An intriguing result observed in our work was the lower serum albumin level presented by the group that performed only the maximum load tests. During pregnancy, serum albumin decreases by result of the increase in plasma and interstitial volume (BENOIT e REY, 2011). However, a further reduction in serum albumin may be related to gestational hypertension, pre-eclampsia, and lower birth weight (STRAWA *et al.*, 2020; WADA *et al.*, 2021). In our study, although we did not find difference in fetal weight, further investigations are needed to understand if this reduction in serum albumin promoted placental and fetal repercussions. In the same RT group, we also found reduction in adipocyte size. White adipose tissue expansion during a health pregnancy is an adaptive response to provide continuous supply of nutrients to the developing fetus (ROJAS-RODRIGUEZ *et al.*, 2015). In pregnant rats, adipocytes undergo a progressive increase in their size and increased proportion of smaller adipocytes (PUJOL *et al.*, 2005). In normal weight pregnant women, the proportion of larger fat cells was greater than that of the smaller, while obese pregnant women showed an expansion of adipose tissue with a decrease in the mean size adipocyte and lower proportion of large cells (SVENSSON *et al.*, 2016). The association between the adipocyte size with the functional role of adipose tissue and pathophysiological conditions has been demonstrated in previous study (STENKULA e ERLANSON-ALBERTSSON, 2018) and the reduction in adipocyte size found may represent impaired expansion capacity.

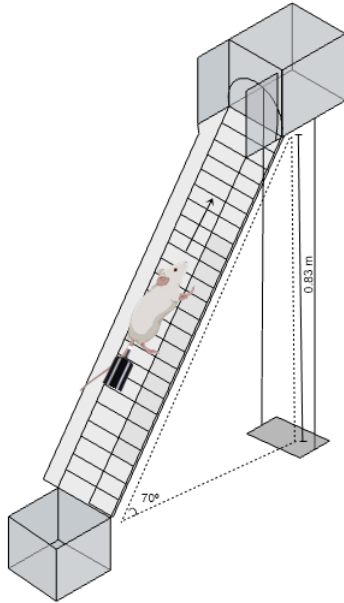
When reproductive parameters were analyzed by sex ratio and number of fetuses, increased number of females fetus was observed in the group that performed only MLT. Male fetus has greater metabolic demands than female fetus (KALISCH-SMITH *et al.*, 2017) and are also less likely to survive in suboptimal conditions (JAMES, 2015). Studies in different species of mammals suggested that offspring sex ratio can be adjusted to environmental conditions, as maternal stress (ROSENFELD e ROBERTS, 2004; KEMME *et al.*, 2009). Previous study in rats reported that a single session of resistance exercise on ladder using 50-100% of maximum voluntary carrying capacity promoted increase in corticosterone plasma levels which is directly related to stress (SILVESTRE *et al.*, 2017). We speculated that performing only a weekly maximum test during pregnancy may have caused greater stress to the mothers and thus

promoted a fetal sex ratio adjustment as reproductive strategy. However, mechanisms responsible for the sex ratio adjustment in rodents are still unknown.

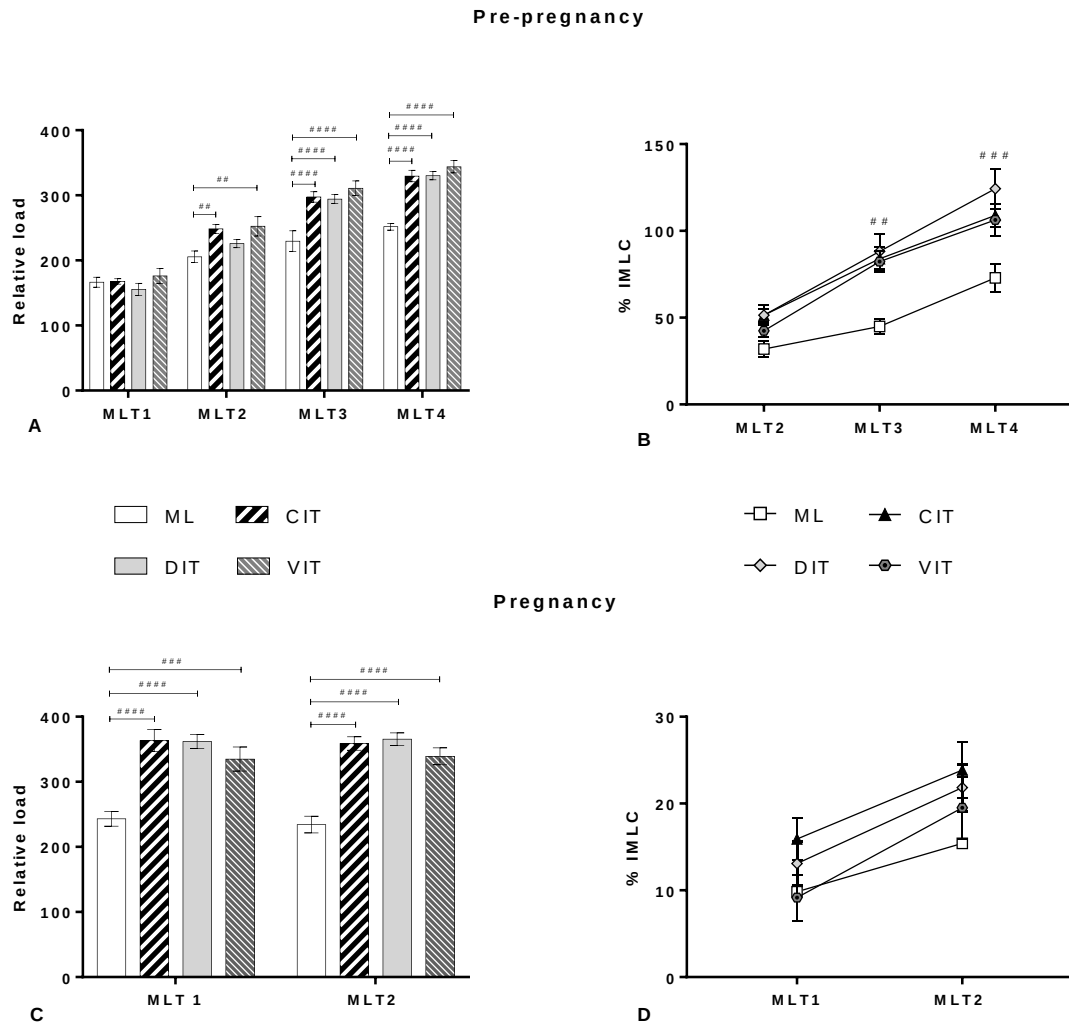
Regarding fetal body weight, a reduction was observed in female fetus from the group that diminished the RT intensity only at the third week of gestation. Previous studies in rats identified that there is a rapid fetal body weight gain from the G17 to G21 (FURUKAWA, TSUJI e SUGIYAMA, 2019) and, that from G15, placenta start to show sex differences with smaller labyrinth volume and reduced blood space surface area in females (KALISCH-SMITH *et al.*, 2017). In our study, DIT group trained at the lowest intensity between G15 and G19, this period coincides with both critical points for fetus weight gain and placental changes. Based on these observations, it is tempting to speculate that the reduction RT intensity in late pregnancy can augment the sex differences naturally observed and impairs female fetus growth. On the other hand, these alterations can still be considered transient. In rats that were submitted to strength training during pregnancy, using training apparatus similar to ours (vertical ladder climbing) but with inclination 85° and 3 times per week (35–75% MLC), lower body weight were observed in offspring at 2nd postnatal day, but when evaluated at 21st postnatal day, were similar to pups from sedentary dams (MEIRELES *et al.*, 2021b). Thus, our results demonstrate the need to evaluate these repercussions at later ages.

To conclude, this study indicate that depend on the RT program different effects are found in maternal health, reproductive performance, and fetal growth. Overall, it is safe to perform RT in pregnant animals that were previously active. RT at higher intensity during all gestation reduces maternal body weight and serum glucose and increases adipocyte size without changing fetus growth. While reducing RT intensity only during the last week of pregnancy decrease maternal and fetal body weight. Perform RT training at low intensity at the beginning and at the end of gestations, as suggested by some guideline to pregnant women, does not change maternal or fetal weight but increases maternal serum triglycerides levels. In general, maintenance of high intensity RT in active rats seems better to maternal and fetal health, however, the abrupt reduction in intensity at the end of gestations may trigger some maladaptive changes that decrease fetal final growth spur and may have future influences.

Figure 1 – Ladder climb apparatus.

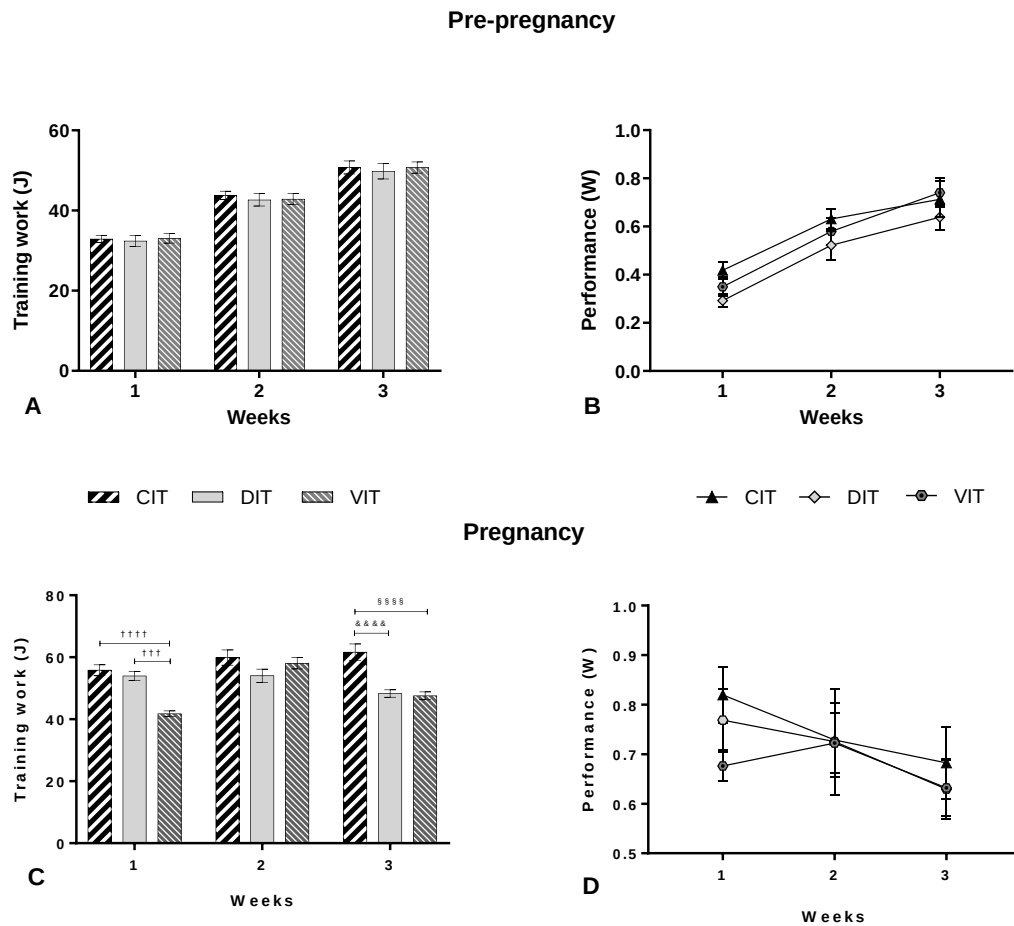


Source: own authorship.

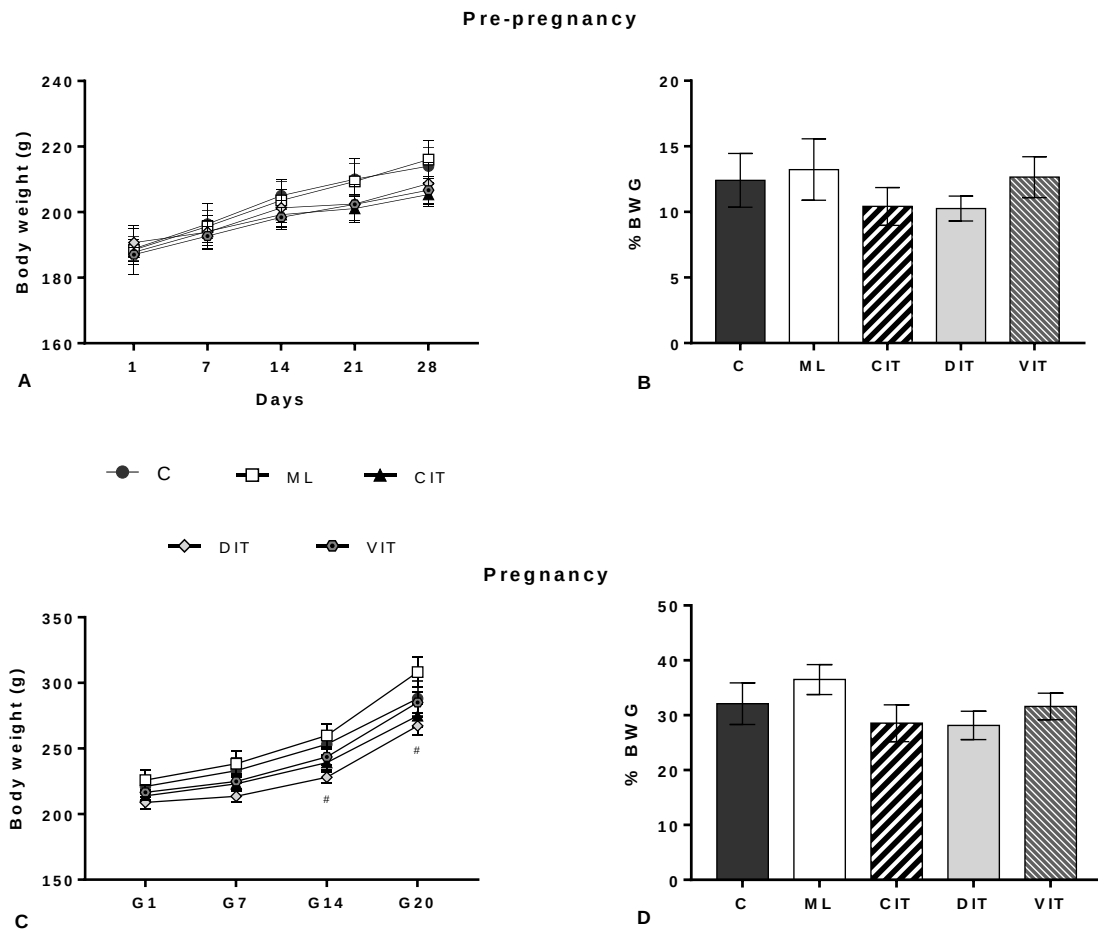
Figure 2. Parameters at maximum load tests.

Relative load before pregnancy (A) and during pregnancy (C) and percentage of initial maximum load carried before pregnancy (B) and during pregnancy (D). Experimental groups were Control (C, n=7); maximum load (ML, n=6); constant-intensity resistance training (CIT, n=7); decreasing-intensity resistance training (DIT, n=7) and variable-intensity resistance training (VIT, n=7). Values are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by repeated measures two-way ANOVA using Tukey's *post hoc* tests. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs. ML group.

Figure 3 – Parameters of resistance training before and during pregnancy.

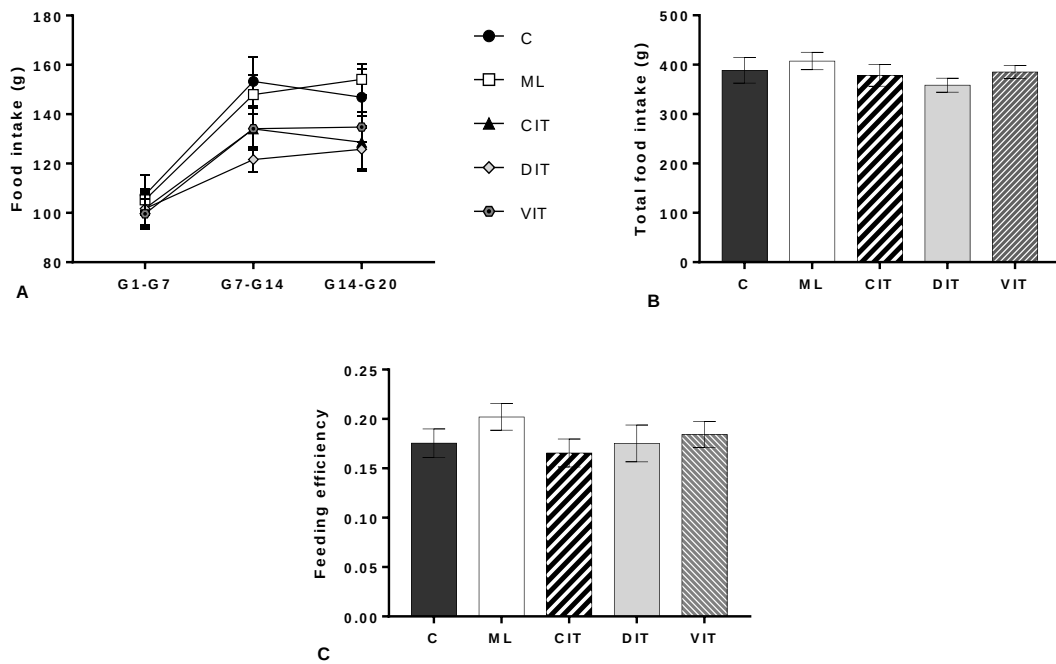


Evolution of the training load calculated from the work (J) performed against gravity before pregnancy (A) and during pregnancy (C) and physical performance before pregnancy (B) and during pregnancy (D). Experimental groups were constant-intensity resistance training (CIT, n=7); decreasing-intensity resistance training (DIT, n=7) and variable-intensity resistance training (VIT, n=7). Values are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by repeated measures two-way ANOVA using Tukey's *post hoc* tests. &&&& $P < 0.0001$ vs. DIT; ††† $P < 0.001$, †††† $P < 0.0001$ vs. VIT.

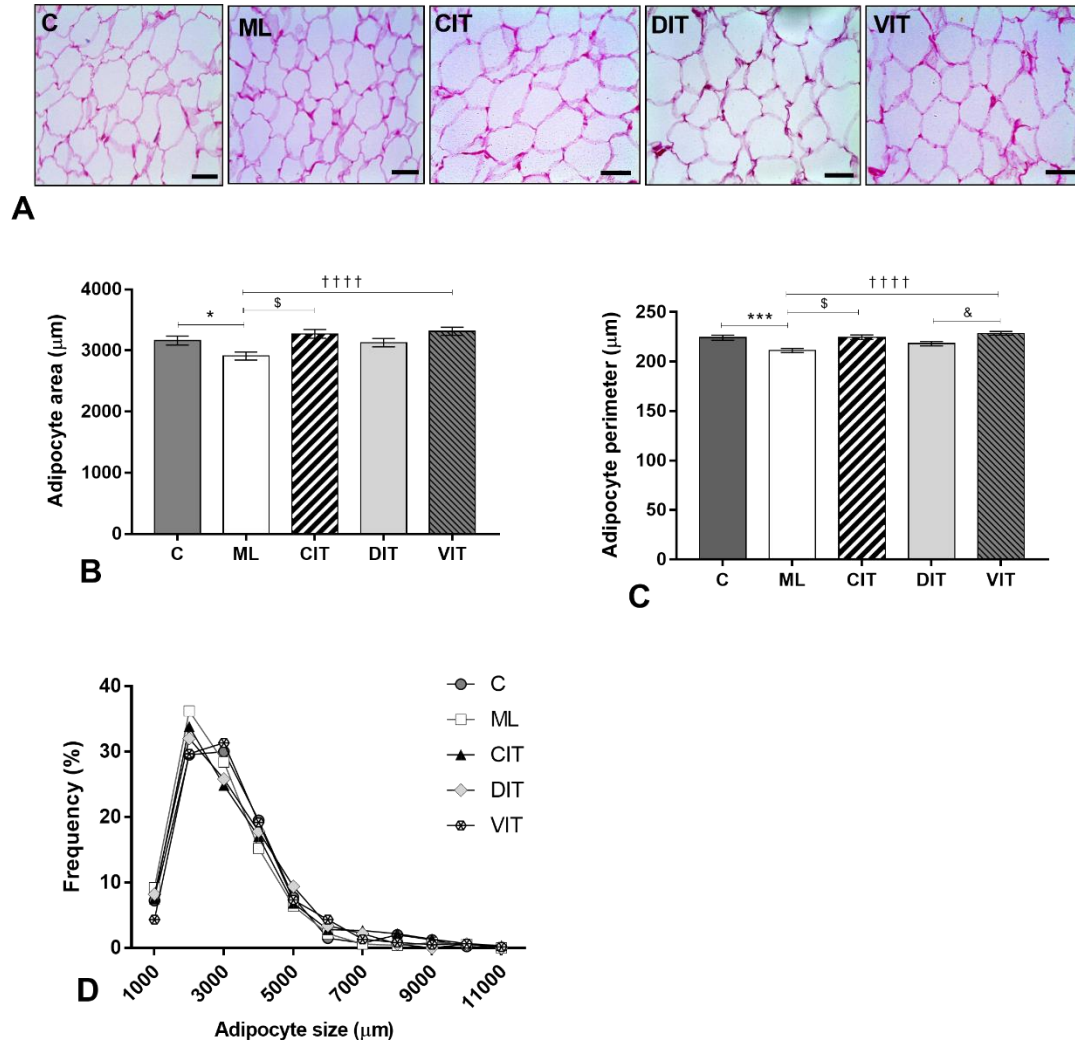
Figure 4 – Parameters of body weight.

Evolution of body weight at pre-pregnancy (A) and pregnancy (C) periods, and percentage of body weight at pre-pregnancy (B) and pregnancy (D) periods. Experimental groups were control (C, n=7); maximum load (ML, n=6); constant-intensity resistance training (CIT, n=7); decreasing-intensity resistance training (DIT, n=7) and variable-intensity resistance training (VIT, n=7). Values are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way (B, D) or repeated measures two-way (A, C) ANOVA using Tukey's *post hoc* test. # $P < 0.05$, CIT and DIT vs. ML.

Figure 5 – Parameters of food intake during pregnancy.

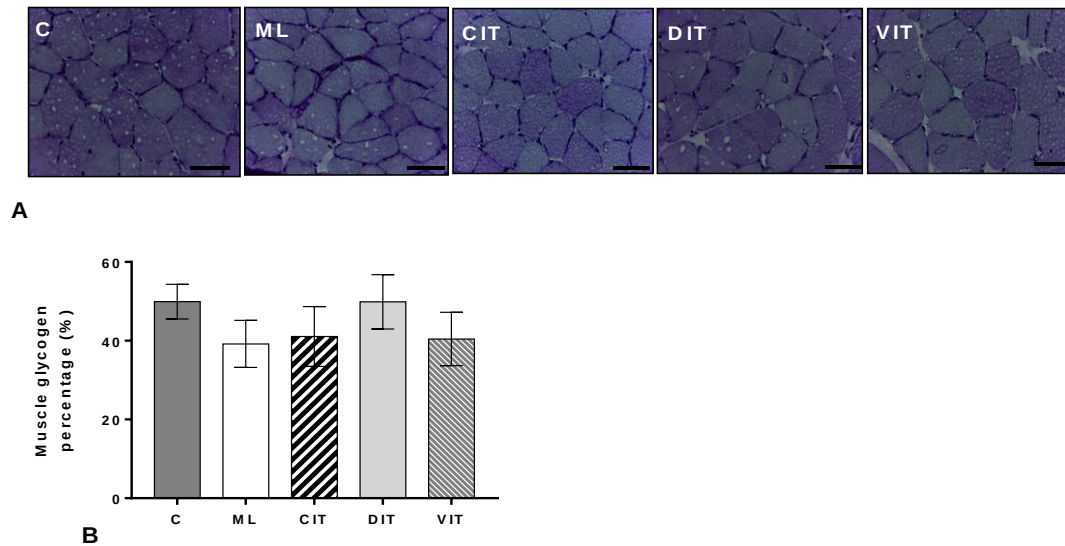


Weekly food intake (A), total food intake (B), and feeding efficiency (C) during pregnancy. Experimental groups were control (C, n=7); maximum load (ML, n=6); constant-intensity resistance training (CIT, n=7); decreasing-intensity resistance training (DIT, n=7) and variable-intensity resistance training (VIT, n=7). Values are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way (B, C) or repeated measures two-way (A) ANOVA using Tukey's *post hoc* test.

Figure 6 – White adipose tissue morphometry.

Representative images of abdominal WAT stained with H&E (40x objective) (**A**); Control (C) (n=4); Maximum Load (ML) (n=5); Constant-Intensity Training (CIT) (n=6); Decreasing-Intensity Training (DIT) (n=5); Variable-Intensity Training (VIT) (n=6), mean adipocyte areas (**B**), mean adipocyte perimeter (**C**), frequency distribution of adipocyte area (**D**). The data are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way test ANOVA followed by Tukey post-test.; * $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs. ML; & $P < 0.05$ vs. DIT.

Figure 7 – Soleus muscle glycogen.



Representative images of soleus muscle stained with PAS (40x objective) (**A**), Control (C) (n=7); Maximum Load (ML) (n=4); Constant-Intensity Training (CIT) (n=5); Decreasing-Intensity Training (DIT) (n=5) and Variable-Intensity Training (VIT) (n=5) (**A**), mean adipocyte areas (**B**), mean adipocyte per. The data are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way test ANOVA followed by Tukey post-test.

Table 1 – Reproductive performance and fetal growth parameters.

	C	ML	CIT	DIT	VIT
Sex ratio	(n=7)	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)
Number of male fetuses	5.71 ± 0.83	4.83 ± 0.79	5.00 ± 0.65	6.14 ± 0.96	4.85 ± 0.63
Number of female fetuses	4,28 ± 0,71	7,16 ± 0,60 *\$&&	4.37 ± 0.53	3.42 ± 0.48	4.85 ± 0.45
Fetal Weight (g)	(n=7-10)	(n=9-11)	(n=12-13)	(n=7-10)	(n=8-12)
Male fetal weight (g)	3.80 ± 0.48	3.724 ± 0.215	3.94 ± 0.33	2.69 ± 0.16\$	3.81 ± 0.49
Female Fetal weight (g)	4.11 ± 0.45	3.721 ± 0.21	3.40 ± 0.30	2.31 ± 0.20*	3.55 ± 0.34
Fetal Growth index	(n=7)	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)
Male fetal growth index	0.05± 0.00	0.05± 0.00	0.07± 0.01	0.04± 0.00	0.05± 0.00
Female fetal growth index	0.05± 0.00	0.04± 0.00	0.06± 0.00	0.03± 0.00	0.05± 0.00

Experimental groups were control (C); maximum load (M); constant-intensity resistance training (CIT); decreasing-intensity resistance training (DIT) and variable-intensity resistance training (VIT). Values are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one or two-way ANOVA using Tukey's *post hoc* test. * P<0.05 vs. C; \$ P<0.05 vs. CIT; & P<0.05, && P<0.01 vs. DIT.

Table 2 – Maternal biochemical parameters.

	C	ML	CIT	DIT	VIT
Biochemical parameters	(n=7)	(n=6)	(n=8)	(n=7)	(n=7)
Glucose(mg/dL)	96.41 ± 2.94	85.46 ± 4.06	77.29 ± 2.64*&	95.96 ± 3.56	85.46 ± 6.59
Triglyceride (mg/dL)	340.5 ± 48.47	250.4 ± 30.56	264.9 ± 35.15	347.2 ± 30.97	414.8 ± 28.85#\$
Total cholesterol (mg/dL)	70.08 ± 2.22	70.48 ± 5.40	71.6 ± 6.45	57.69 ± 1.63	59.04 ± 4.21
Albumin (mg/dL)	2.68 ± 0.12	2.15 ± 0.12 ** \$&†	2.60 ± 0.64	2.55 ± 0.07	2.62 ± 0.09

Experimental groups were Control (C); maximum load (ML); constant-intensity resistance training (CIT); decreasing-intensity resistance training (DIT) and variable-intensity resistance training (VIT). Values are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's *post hoc* tests. * P<0.05, ** P<0.01 vs. C; # P<0.05 vs. ML; \$ P<0.05 vs. CIT; & P<0.05 vs. DIT; † P<0.05 vs. VIT.

REFERENCES

- ACOG. Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period: ACOG Committee Opinion, Number 804. **Obstet Gynecol**, v. 135, n. 4, p. e178-e188, 2020.
- AHTIAINEN, J. P. et al. Physiological adaptations to resistance training in rats selectively bred for low and high response to aerobic exercise training. **Exp Physiol**, v. 2018 Nov;103(11):1513-1523. doi, n. 2018 Oct 9, p. 10.1113/EP087144,
- _____. Physiological adaptations to resistance training in rats selectively bred for low and high response to aerobic exercise training. **Exp Physiol**, v. 103, n. 11, p. 1513-1523, Nov 2018.
- ANTONIO-SANTOS, J. et al. Resistance Training Alters the Proportion of Skeletal Muscle Fibers but Not Brain Neurotrophic Factors in Young Adult Rats. **J Strength Cond Res**, v. 30, n. 12, p. 3531-3538, Dec 2016.
- AOCG. Macrosomia: ACOG Practice Bulletin, Number 216. v. 135, n. 1, p. e18-e35, 2020.
- BENOIT, J.; REY, É. Preeclampsia: should plasma albumin level be a criterion for severity? **J Obstet Gynaecol Can**, v. 33, n. 9, p. 922-926, Sep 2011.
- BØRSHEIM, E.; BAHR, R. Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. **Sports Med**, v. 33, n. 14, p. 1037-1060, 2003.
- BROWN, J. D.; NAPLES, S. P.; BOOTH, F. W. Effects of voluntary running on oxygen consumption, RQ, and energy expenditure during primary prevention of diet-induced obesity in C57BL/6N mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 3, p. 473-478, 2012.
- BROWN, W. J. et al. Evidence-based physical activity guidelines for pregnant women. **Australian Government, Canberra**, 2020.
- CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutr Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 98-109, Feb 2019.
- CARROLL, T. J.; RIEK, S.; CARSON, R. G. Neural adaptations to resistance training: implications for movement control. **Sports Med**, v. 31, n. 12, p. 829-840, 2001.
- CLAPP, J. F., 3RD et al. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 6, p. 1484-1488, Dec 2000.
- CLAPP, J. F., 3RD et al. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 142-147, Jan 2002.
- DIPLA, K. et al. Exercise as a Therapeutic Intervention in Gestational Diabetes Mellitus. **Endocrines**, v. 2, n. 2, p. 65-78, 2021.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, Feb 14 2013.

FRAGOSO, J. et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. **Exp Physiol**, v. 102, n. 11, p. 1486-1499, 2017.

FURUKAWA, S.; TSUJI, N.; SUGIYAMA, A. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. **J Toxicol Pathol**, v. 32, n. 1, p. 1-17, Jan 2019.

GAILLARD, R.; WRIGHT, J.; JADDOE, V. W. V. Lifestyle intervention strategies in early life to improve pregnancy outcomes and long-term health of offspring: a narrative review. **J Dev Orig Health Dis**, v. 10, n. 3, p. 314-321, Jun 2019.

HADDEN, D. R.; MCLAUGHLIN, C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 14, n. 2, p. 66-71, Apr 2009.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur J Clin Nutr**, v. 54, n. 1, p. 1600984, 2000.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

JAMES, W. H. Proximate causes of the variation of the human sex ratio at birth. **Early Human Development**, v. 91, n. 12, p. 795-799, 2015/12/01/ 2015.

JANG, Y. et al. Involuntary swimming exercise in pregnant rats disturbs ERK1/2 signaling in embryonic neurons through increased cortisol in the amniotic fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 1208-1213, 2018/01/01/ 2018.

KALISCH-SMITH, J. I. et al. Sex differences in rat placental development: from pre-implantation to late gestation. **Biol Sex Differ**, v. 8, p. 17, 2017.

KEMME, K. et al. An unstable social environment affects sex ratio in guinea pigs: an adaptive maternal effect? **Behaviour**, v. 146, n. 11, p. 1513-1529, 2009.

LADYMAN, S. R. et al. A reduction in voluntary physical activity in early pregnancy in mice is mediated by prolactin. **eLife**, v. 10, p. e62260, 2021/09/16 2021.

LAZO-OSÓRIO, R. A. et al. Effect of physical training on metabolic responses of pregnant rats submitted to swimming under thermal stress. **J Res Med Sci**, v. 14, n. 4, p. 223-230, 2009.

MEIRELES, A. L. F. et al. Strength training during pregnancy influences hippocampal plasticity but not body development in neonatal rats. n. 1108-7161 (Print), 2021a.

MEIRELES, A. L. F. et al. Strength training during pregnancy influences hippocampal plasticity but not body development in neonatal rats. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 21, n. 2, p. 279-286, 2021b.

PHILIPPE, A. G. et al. Modelling performance and skeletal muscle adaptations with exponential growth functions during resistance training. **J Sports Sci**, v. 37, n. 3, p. 254-261, Feb 2019.

PIERCY, K. L. et al. The Physical Activity Guidelines for Americans. n. 1538-3598 (Electronic), 2018.

PUJOL, E. et al. Pregnancy effects on rat adipose tissue lipolytic capacity are dependent on anatomical location. **Cell Physiol Biochem**, v. 16, n. 4-6, p. 229-236, 2005.

REYES, L. M.; DAVENPORT, M. H. Exercise as a therapeutic intervention to optimize fetal weight. **Pharmacological Research**, v. 132, p. 160-167, 2018/06/01/ 2018.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiol Rev**, v. 93, n. 3, p. 993-1017, 2013.

ROJAS-RODRIGUEZ, R. et al. Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 58, n. 9, p. 2106-2114, Sep 2015.

ROSENFELD, C. S.; ROBERTS, R. M. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. **Biol Reprod**, v. 71, n. 4, p. 1063-1070, Oct 2004.

SANCHES, A. P. V. et al. Obesity phenotype induced by high-fat diet leads to maternal-fetal constraint, placental inefficiency, and fetal growth restriction in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 104, p. 108977, 2022/06/01/ 2022.

SANTANA MUNIZ, G. et al. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. **Physiol Behav**, v. 129, p. 1-10, 2014.

SILVESTRE, J. G. et al. Acute effects of resistance exercise performed on ladder on energy metabolism, stress, and muscle damage in rats. **Motriz, Rio Claro**, v. vol. 23, 2017.

SOARES, T. S. et al. Maternal-fetal outcomes of exercise applied in rats with mild hyperglycemia after embryonic implantation. **Birth Defects Research**, v. 113, n. 3, p. 287-298, 2021/02/01 2021.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovasc J Afr**, v. 27, n. 2, p. 89-94, Mar-Apr 2016.

SON, J. S. et al. Exercise prevents the adverse effects of maternal obesity on placental vascularization and fetal growth. **J Physiol**, v. 597, n. 13, p. 3333-3347, 2019.

SONGSTAD, N. T. et al. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143095, 2015.

STENKULA, K. G.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Adipose cell size: importance in health and disease. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 315, n. 2, p. R284-r295, Aug 1 2018.

STRAWA, A. et al. Can variability of serum electrophoretic fractions during pregnancy provide knowledge about maternal and fetal health. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 46, n. 9, p. 1783-1789, Sep 2020.

SVENSSON, H. et al. Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. **Int J Obes (Lond)**, v. 40, n. 4, p. 646-653, Apr 2016.

WADA, Y. et al. Maternal Serum Albumin Redox State Is Associated with Infant Birth Weight in Japanese Pregnant Women. **Nutrients**, v. 13, n. 6, May 22 2021.

WUYTS, C. et al. Continuous glucose monitoring during pregnancy in healthy mice. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 4450, Feb 24 2021.

ZENG, Z.; LIU, F.; LI, S. Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 1, p. 59-65, 2017.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL 2

Title: Resistance training during pregnancy alters placental cell composition and nutrient transport impacting fetal growth in an intensity-dependent manner.

Abstract

This study investigated the effects of different intensities of resistance training during pregnancy on placental cell composition, expression of genes involved in placental growth and nutrient transport and fetal growth. Thirty female Wistar rats were randomly assigned into Control (C), Maximum Load (ML), Constant-Intensity Training (CIT), Variable-Intensity Training (VIT), Decreasing-Intensity Training (DIT) groups. Before pregnancy, the resistance training (RT) was performed in ladder climbing (5 sessions/week; 80% of the maximum load carried (MLC)). In pregnancy, the intensity of RT was adjusted by % MLC, to first, second and third week: CIT group: 80%, 80% and 80%; DIT group: 80%, 80% and 50% and VIT group: 50%, 80% and 50%. The load of the RT protocols was adjusted weekly by the maximum load test (MLT). DIT reduced fetal growth and placental efficiency with greater impact on female fetuses and without changes on placental histology or gene expression. MLT and VIT presented lower percentage of syncytiotrophoblast and higher percentage of fetal capillaries in placental labyrinth zone accompanied of increase *Snat1* mRNA expression in ML group and *Glut1* mRNA in VIT group. CIT group showed only increased placental *Glut1* mRNA expression. These data indicate that placental change in cell composition and nutrients transporters are not dependent on damage on fetal growth and may be considered adjustments to ensure better outcomes on fetal growth, but it is not known if this will affect the offspring's later health. Thus, maintain the intensity of the RT equal to pre-pregnancy period appeared safe for fetal-placental growth, whereas performing MLT and altering in intensity of the RT during pregnancy affects fetal-placental growth.

KEYWORDS: pregnancy; resistance training; fetal growth; nutrient transport; growth factors.

1. Introduction

The Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) theory focus to understand how environmental stimuli during critical periods of development can influence the development of health or unhealthy phenotype later in life (GLUCKMAN, BUKLIJAS e

HANSON, 2016). Periconceptional and gestational periods are very sensible ones when environmental stimuli can change triggering fetal adaptations that can have lasting consequences (CAMERON e DEMERATH, 2002). Numerous studies have sought to elucidate the mechanisms of DOHaD, highlighting the growing evidence of the central role of the placenta (MYATT, 2006; KWON e KIM, 2017). Regarding the environmental stimuli, previous studies have reported that maternal exercise may alter placental development and functionality with impact on fetal outcome (CLAPP *et al.*, 2000a; CLAPP *et al.*, 2002; MANGWIRO *et al.*, 2018; MANGWIRO *et al.*, 2019).

High-volume of aerobic exercise at moderate intensity in early pregnancy and low-volume in mid to late pregnancy increases volume of villous tissue of placenta associated with higher birth body weight (CLAPP *et al.*, 2000a; CLAPP *et al.*, 2002). Whereas high-volume exercise in mid to late pregnancy reduced birth body weight and volume of placental villous tissue (CLAPP *et al.*, 2002). In rats, aerobic training during pre-pregnancy and pregnancy periods promoted greater area of labyrinth zone and increased expression of SNAT1, SNAT2 in placenta accompanied by increased fetal body weight, whereas training only during pregnancy period increases VEGFA and decreases PGF, SNAT4 and mTOR without changing fetal body weight (MANGWIRO *et al.*, 2018; MANGWIRO *et al.*, 2019; MANGWIRO *et al.*, 2021) Voluntarily very active pregnant rats showed upregulation of NTF4 in the placenta (FRAGOSO *et al.*, 2020). In pregnant women, regular physical activity increased VEGF and VGFR-1 in the placenta, indicating that aerobic exercise can be pro-angiogenic (BHATTACHARJEE *et al.*, 2021).

Despite the studies mentioned above, there is a lack of investigation using resistance training (RT) during pregnancy. Guidelines recommend that, in the absence of obstetric complications, women who were physically active before pregnancy can continue to perform aerobic exercise, even in vigorous-intensity (ACOG, 2020). However, for RT, it is recommended to reduce the load compared with prepregnant conditions because RT is not considered a safe activity due to a possible fetal heart deceleration promoted by the Valsalva maneuvers (PIERCY *et al.*, 2018; ACOG, 2020). Theoretically, RT could decrease fetal blood flow due to increased maternal blood pressure and intra-abdominal pressure in Valsalva maneuver (BØ *et al.*, 2016). This alteration in the placental bed blood flux could modify oxygen and nutrient delivery system to the fetus leading to changes in placental development and fetal growth (CLAPP *et al.*, 2000b; CLAPP, 2003). In rats, RT during pregnancy promoted transitory reduction in body weight until (21st postnatal day) (MEIRELES *et al.*, 2021b) but a better

performance on memory and learning tasks in adult offspring (MEIRELES et al., 2021a). However, the influence of resistance exercise during pregnancy on fetal-placental growth is unknown. Therefore, the main purpose of this study was to investigate the effects of variation of RT intensity during pregnancy in previously active rats on placental structure and gene expression and fetal growth.

2. Methods

2.1 Animals

The Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco approved all experiments, (Protocol number: 0059/2018) following the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Thirty virgin female albino Wistar rats weighted 180-220g, aged 60-70 days were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. Animals were maintained in a controlled environment ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12:12h light-dark cycle (dark 08:00 AM – 08:00 PM) with free access to food and water. The rats were randomly assigned to five groups defined by manipulation before and during pregnancy. Control group (C) that did not perform maximum overload tests or resistance training. Maximum Load group (ML) that performed only maximum load tests once a week before and during pregnancy. All trained groups performed the same resistance training before pregnancy, but RT intensities varied during pregnancy and are described below: Constant-Intensity Training group (CIT), Decreasing-Intensity Training group (DIT), Variable-Intensity Training group (VIT). The females were mated at a ratio of 1 male to 1 female and the pregnancy was confirmed by spermatozoa in the vaginal smear. This day was registered as gestational day 0 (G0). Pregnant rats were killed at G20.

2.2 Resistance training protocol

The resistance training (RT) protocol was performed as previously described (Article 1). Briefly, to familiarize females of the trained groups (CIT, VIT and DIT) and ML group were exposed to the ladder and the load apparatus. Next, all rats in the trained group performed 3 weeks of resistance training in the ladder before pregnancy (5 sessions/week, 8-9 climbs/session, with 90 seconds of rest between climbs, at 80% of the maximum Load Carried (MLC). During pregnancy, from G1 to G19, training intensity differed among trained groups in the gestational weeks. CIT group trained with 80% of MLC during all weeks of pregnancy. DIT group trained at first and second weeks of pregnancy at 80% of MLC and during the third

week of pregnancy at 50% of MLC. VIT group trained during the first and third weeks of pregnancy at 50% of MLC and during the second week of pregnancy at 80% of MLC). The load of resistance training programs before and during pregnancy were defined by weekly performance in Maximum Load Test (MLT). At the first MLT, initial load was 75% of the animal's body weight with 120 seconds of rest between climbs. After each successful climb 30 g was added to the load apparatus and the failure was considered when an animal could not climb the ladder in 2 successive attempts. The Maximum Load Carried (MLC) was considered the highest load reached in the last successful climb. In subsequent MLTs the load of the first two climbs was 80% and 100% from the last MLT and 30 g were added at the others climbs until failure. Females from Control and Maximum Load groups were manipulated in the training room to mimic any stress that the environment could cause in the trained groups.

2.4 Samples collection measurements

The rats were killed by decapitation on the 20th day of pregnancy. Immediately after decapitation, the uterus was exposed and removed. All placentas and their respective fetus were removed and weighted. A part of placentas was fixed in 10% formalin and the other, immediately, frozen in dry-ice and stored at -80°C until analysis. The sex of the fetus was determined by the anogenital distance. Fetal growth was assessed by body weight, body length, tail length, antero-lateral skull axis and anteroposterior head axis measurements. A digital balance and a digital caliper were used. Placental efficiency was determined by the formula: fetal weight (g)/ placental weight (g) (HAYWARD *et al.*, 2016).

2.4 Histological analysis

Fixed placentas were dehydrated in increasing concentration of ethanol, cleared in xylene, embedded in paraffin, and sectioned in microtome (Leica RM 2255) at 4µm. After that, the sections were deparaffinized and rehydrated and submitted to hematoxylin-eosin (HE) staining. Then, sections were washed in running water to remove excess of stain and after drying, were mounted using Entellan New. The images of sections were obtained by microscope Olympus BX50 (40X objective) attached to the camera and Leica LA EZ software used for image collection. The morphometric analysis of the placenta was performed using grid with 110 points in 10 images per animal using cell count plugin of Image J. The labyrinth zone composition was determined by counting of each type of cell classified as: (1) maternal blood space, (2) syncytiotrophoblast, (3) cytotrophoblast, (4) fetal capillary, (5) vessel lumens, (6)

connective tissue. In placenta morphometric analyses were considered the count of a total of 1100 intersections points per animal using cell count plugin of Image J (NIH, USA). For analysis of total placental area and thickness and labyrinth area, images acquired by digital camera and then measured using free Hand and straight-line tools of Image J.

2.5 Quantitative RT-PCR

RNA was extracted from 50-100mg placenta (longitudinal cut considering umbilical cord as reference) using Trizol® reagent, following the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). RNA pellets were washed in 75% ethanol and redissolved in RNase-free water. Total RNA was quantified using NanoDrop. The purity was verified by the A260/280 ratio. A ratio higher than 1.9 was considered pure. We performed real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA). PCR primers were purchased for GLUT-1 (SLC2a1; NM_138827.2), GLUT-3 (SLC2a3; NM_017102.2), SNAT1 (SLC38a1; NM_138832.1), FATP4 (Slc27a4; NM_001100706.1), FABP3 (NM_024162.2), NTF-4 (NM_013184.4), PGF (NM_053595.2); mTOR (NM_019906.2) and Hsd11b2 (NM_017081.2). The beta-2 microglobulin gene (B2m) was considered endogenous control. The relative expression levels of mRNAs in different samples were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparative method.

2.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA). The Shapiro-wilk test was used to determine whether the data have a normal distribution. Analysis of variance, one-way ANOVA followed Tukey's post hoc test, was employed for the comparison among the five groups. All results are expressed as means $\pm$ SEM and the threshold for statistical significance was considered $p < 0.05$.

3.0 Results

3.1 Placental and fetal parameters

No differences were found in placental weight among groups (Table 1). Male and female fetuses body weight from DIT group was lower compared to CIT and Control group respectively (male: $P < 0.05$ vs. CIT; female: $P < 0.05$ vs C) (Table 1). Female fetus from DIT group also showed smaller longitudinal axis (compared to CIT group, $P < 0.05$) and lower placental efficiency (compared to C, ML and CIT groups; $P < 0.01$ vs. C and CIT, $\#P < 0.05$ vs.

ML) (Table 1). No differences were found other somatic growth parameters between the groups (Table 1).

In placental labyrinth zone, the ML and VIT groups showed a lower percentage of syncytiotrophoblast compared to control group (ML: $p < 0.001$ vs C; VIT: $p < 0.05$ vs. C;), and higher percentage of fetal capillaries (ML: $p < 0.01$ vs C; VIT: $p < 0.001$ vs. C) (Fig 1. A-K). No differences were found in the other parameters evaluated (Fig 1. A-K).

3.3 Placental genes expression

CIT and VIT group presented increased *Glut1* mRNA expression in placenta compared to Control group (CIT: $p < 0.05$; VIT: $p < 0.01$ vs. C). Whereas the ML group showed increased *Snat1* mRNA expression in placenta compared to all other groups ($P < 0.0001$). No differences were found in the other genes evaluated (Fig. 2 and 3).

4. Discussion

Variable-intensity training or performing the maximum load test weekly promoted lower percentage of syncytiotrophoblast and higher presence of fetal capillary in the placental labyrinth area, despite no changes on placental area and fetal growth. Decreasing the RT intensity at the end of gestations reduced fetal body weight in male and female fetus, but the females' ones were also shorter and presented reduced placental efficiency. These changes were not accompanied by modifications in placental histology or gene expression. RT different affected nutrient transport, as increased *Glut1* expression was found in CIT and DIT groups and increased *Snat1* expression in ML groups.

We believe that the intensity of the MLT without regular exercise or the return to pre-pregnancy intensity in the second week of pregnancy after a reduction of the intensity in the first week alter uterine blood flow at a critical moment for syncytiotrophoblast and fetal capillary network formation (SIMMONS, 2014). During RT exercise there is the possibility of reduction in uterine blood flow to allow increased blood perfusion to exercising muscle and it suggested intermittent periods of fetal hypoxia during exercise (CLAPP *et al.*, 2000b; CLAPP, 2003). It has been hypothesized that increased fetal heart rate (FHR) in response to acute exercise may be due to reduction in uteroplacental blood flow and consequent fetal hypoxia (SKOW *et al.*, 2019). However, during chronic exercise, less impact or no change in uterine blood flow and FHR are observed (SKOW *et al.*, 2019). Interestingly, pregnant women at gestational age from 13 and to 28 weeks who underwent moderate-to-heavy RT at one

maximum repetition (1-RM) did not decrease placental blood flow during the Valsalva maneuver and in women who participated in structured exercise programs an increase in placental blood flow was observed (GOULD *et al.*, 2021). However, in another study with pregnant women not engaged in regular physical exercise, the resistance exercise session in late gestation at 90% of 10-RM increased the frequency of FHR accelerations (AVERY *et al.*, 1999), it may suggest that possible fetal hypoxia is dependent on maternal conditioning and exercise intensity.

In critical phases of placentation that involves the development of the labyrinth zone, branching morphogenesis, and differentiation of chorionic trophoblast cells (for more details access (WATSON e CROSS, 2005; SIMMONS, 2014)), oxygen concentrations dictate the uterine vascular remodeling directed by trophoblast cells and the development of the nutrient delivery system (SOARES, IQBAL e KOZAI, 2017). In the face of changes in oxygen concentration, some adjustments are necessary to maximizing nutrient delivery without damaging the placenta (SOARES, IQBAL e KOZAI, 2017). The syncytiotrophoblast represent the major functional component of the placenta involved in exchange of nutrients, metabolites and gases between the fetus and mother (LAGER e POWELL, 2012). Previous study observed that the syncytiotrophoblast is prone to apoptosis and necrosis under oxidative stress and hypoxia conditions (MA *et al.*, 2021). In pregnant women exposed to decreased oxygen tension at high altitude has been observed alterations to the vasculature with increase in fetal capillary representing an adaptive response to facilitate nutrient flow to the placenta and fetus (TISSOT VAN PATOT *et al.*, 2003).

Interestingly, we recently reported that MLT promoted reduction of serum albumin in pregnant rats. It has been suggested that reduced serum albumin levels enhance of the oxidative stress (SAITOU *et al.*, 2021) and species (ROS) (SILVESTRO *et al.*, 2020). This reinforces our hypothesis on the reduction of the uterine blood flow and exposure to hypoxia. Furthermore, previous study showed that female fetuses having a greater capacity than male to compensate for intrauterine hypoxia (THOMPSON, TURAN e ABERDEEN, 2020) and coincidentally we showed that the ML group had more female than male in the litter. These results raise the question if the MLT really promotes a fetal sex ratio adjustment as reproductive strategy to protect against hypoxia (ROSENFELD e ROBERTS, 2004; KEMME *et al.*, 2009).

To our knowledge we are the first study to analyze histological composition of the placental labyrinth zone of rodents in response to RT. In other studies, also using pre-pregnancy and pregnancy period, aerobic exercise training, 5 days/week, with progressive reduction of the

speed and session time at each pregnancy week promoted greater placental efficiency accompanied by increased fetal weight, without change in placental labyrinth area. (MANGWIRO *et al.*, 2021). While in swimming protocol, 5 days/week for 9 weeks, with progressive increase in training time, it was found increased placental volume and thickness with no changes in blood vessel number and fetal weight (ABATE *et al.*, 2012). It demonstrates that the type and intensity of exercise should be considered when analyzing the outcomes on the placenta and fetuses, as such as cell composition of the labyrinth region, that was not explored in previous studies. Interestingly, the DIT group that reduced RT intensity only on third week of pregnancy showed reduction in the fetal weight, longitudinal axis, and placental efficiency without any change in placental cell composition.

To better understand these results, we investigate the expression of *Glut1*, *Glut3*, *Snat1*, *Fatp4* e *Fabp3* mRNA involved in nutrient transport and in development and functionality of the placenta. However, the DIT group showed no differences in the gene expression analysis. Thus, other mechanisms that affect fetal growth as the exercise-induced inflammatory response may be involved. Although increased systemic inflammation during a normal pregnancy is a physiological response (ROMERO *et al.*, 2007), dysregulation in maternal immunity can result in higher risk of inflammatory complications (HARMON *et al.*, 2016). In previous study, higher cytokine pro-inflammatory IL-6 level was associated with low birth weight and length (RAGSDALE *et al.*, 2019). Considering that the exercise may transiently cause inflammation during and after its execution (ACOSTA-MANZANO *et al.*, 2019), we believe that the reduction of intensity in a period of rapid fetal growth can trigger an inflammatory that, even in the short term, can affect the growth.

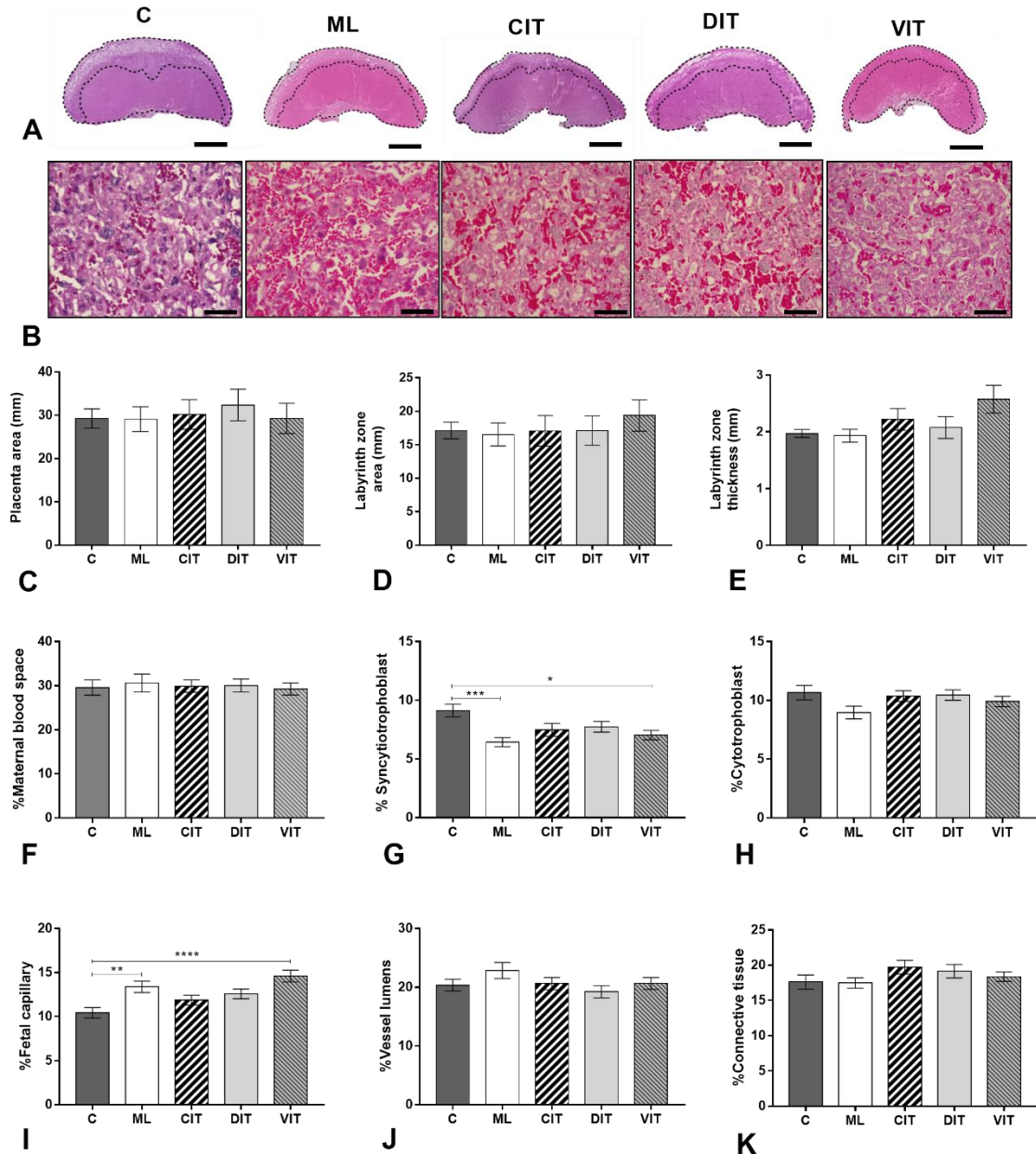
When we analyzed the expression of placental genes in the other groups, CIT and VIT group presented higher expression of *Glut1*, whereas ML group showed higher expression levels of *Snat1*. GLUT1 is the primary glucose transport present in trophoblast cells of the labyrinth zone (WANG *et al.*, 2006). while SNAT1 is one of the major contributors to system A that mediates cellular uptake of neutral amino acid in the placenta (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Previous studies showed that changes in glucose and amino acid supply can result in fetal growth abnormalities (WINTERHAGER e GELLHAUS, 2017). In hypoxic environment, *Glut1* or *Glut3* expression was stimulated by hypoxia inducible factor-1a (JANZEN *et al.*, 2013; CHAE, SON e DU, 2022), whereas the reduction of *Snat1* expression was associated with intrauterine growth restriction (IUGR) (CHEN *et al.*, 2015). Thus, the results that we found in

this study may reflect increased placental or fetal glucose and amino acid supply to improve fetal growth.

Although the DIT and ML group have a higher mean expression *11 β -hsd2*, no statistical difference was found. A similar result was found by Mangwiro *et al.* 2021, with aerobic training before and during pregnancy. *11 β -hsd2* is expressed during pregnancy mainly in syncytiotrophoblast in placenta and has a high capacity to inactivate glucocorticoid (cortisol in humans, corticosterone in rats) (KONSTANTAKOU *et al.*, 2017). Analysis of maternal corticosterone levels in future investigations may help clarify whether resistance training and MLT can cause maternal stress.

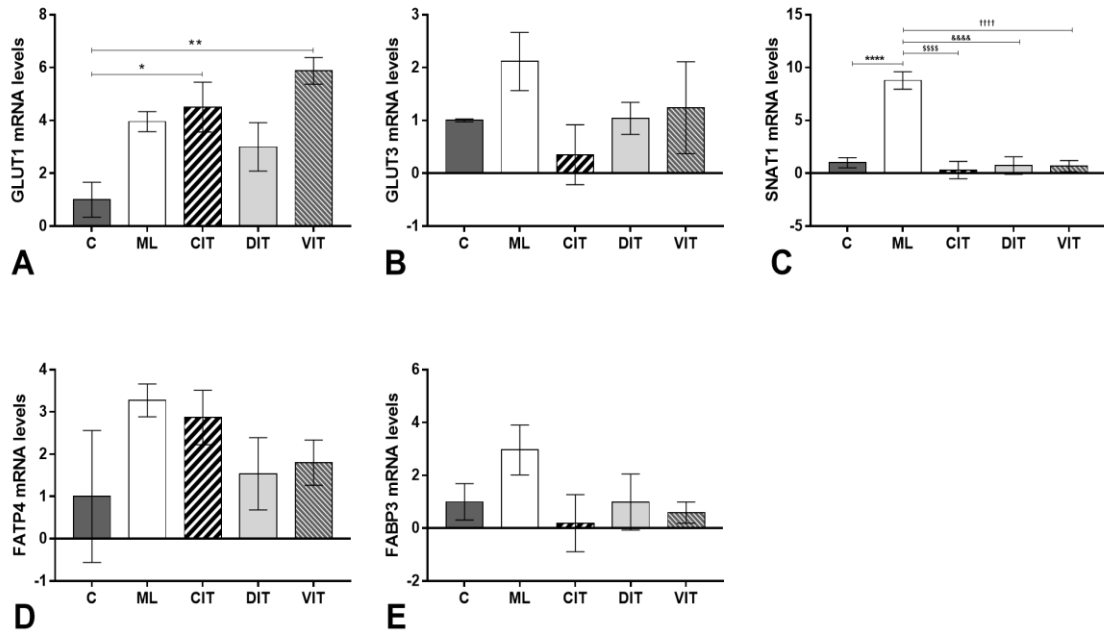
Placental growth factor (PGF), a member of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family, and neurotrophin-4 (NTF-4) are mainly involved in angiogenesis (KRAEMER e HEMPSTEAD, 2003; CHAU, HENNESSY e MAKRIS, 2017). PGF is also vital to vessel formation and in trophoblast cell proliferation (ARROYO *et al.*, 2014; RÄTSEP *et al.*, 2014). In view of the results observed in placental morphology in VIT and ML group, we expected change in *Pgf* and *Ntf-4* expression, but no differences was found. Knowing that the PGF and NTF-4 influence other pathways involved in angiogenesis and differentiation of trophoblast cell, as VEGF and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (CHAU, HENNESSY e MAKRIS, 2017; SAHAY, SUNDRANI e JOSHI, 2017). Quantifying these factors could help to better understand the results found.

In conclusion, this study demonstrates that maintain the intensity of the RT equal to pre-pregnancy period appeared safe for fetal-placental growth, whereas alteration in intensity of the RT during pregnancy and MLT seems to be a trigger for adjustments in nutrient transporter and cell composition of the placental labyrinth area to ensure better outcomes on fetal growth. Therefore, more investigations are needed to verify the offspring's later health and to understand what mechanisms are contributing to reduction in fetal growth when the intensity is reduced only in late pregnancy.

Figure 1 – Placental morphology.

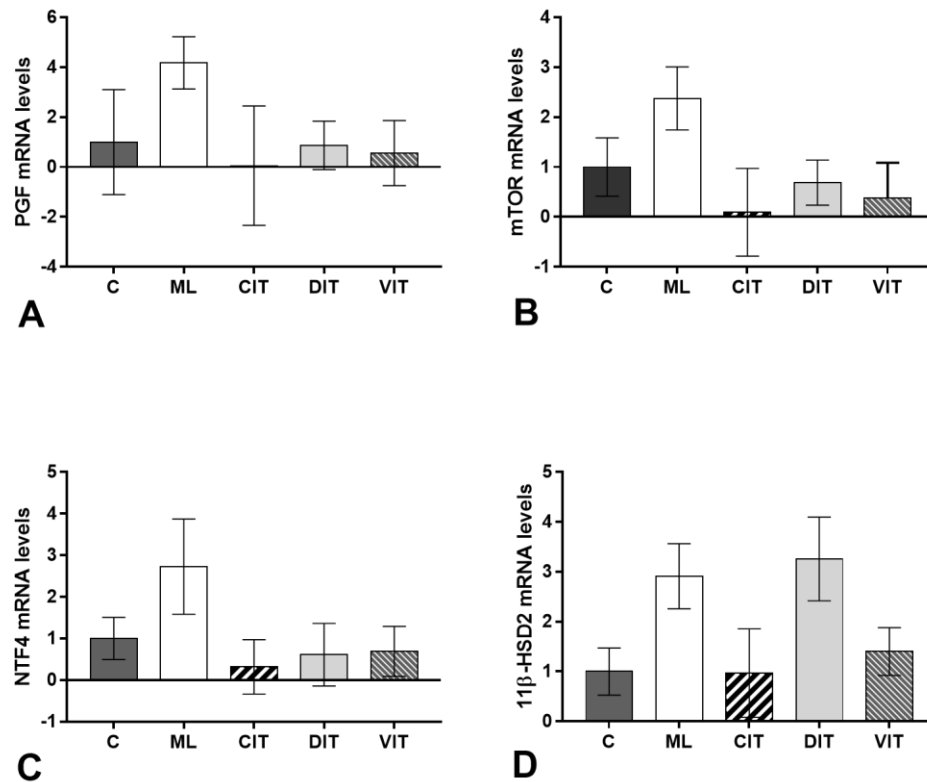
Representative image of placental cross-sectional area (A) and labyrinth zone (B) from dams submitted or not to resistance training during pregnancy stained with H&E (40x objective). Experimental groups were Control (C, n=5); Maximum Load (ML, n=6); Constant-Intensity Training (CIT, n=7); Decreasing-Intensity Training (DIT, n=6); Variable-Intensity Training (VIT, n=6). The data are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's *post hoc* test. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. C.

Figure 2 – Placental mRNA expression of nutrient transporters.



Experimental groups were Control (C, n=3-4); Maximum Load (ML, n=3-5); Constant-Intensity Training (CIT, n=3-4); Decreasing-Intensity Training (DIT, n=3-5); Variable-Intensity Training (VIT, n=4-5). The data are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's *post hoc* test. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs C; \$\$\$\$ $P < 0.0001$ vs. CIT; &&&& $P < 0.0001$ vs. DIT; +++++ $P < 0.0001$ vs. VIT.

Figure 3 – mRNA expression placental growth and neurotrophic factors, nutrient sensor and enzymes.



Experimental groups were Control (C, n=3-4); Maximum Load (ML, n=3-5); Constant-Intensity Training (CIT, n=3-4); Decreasing-Intensity Training (DIT, n=3-5); Variable-Intensity Training (VIT, n=4-5). The data are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA using Tukey's *post hoc* test.

Table 1 – Fetal and Placental growth parameters.

	C	ML	CIT	DIT	VIT
	(n=8-10)	(n=9-10)	(n=12-13)	(n=9-10)	(n=8-12)
Male fetuses					
Fetal weight (g)	3.80 ± 0.48	3.724 ± 0.21	3.94 ± 0.33	2.69 ± 0.16\$	3.81 ± 0.49
Placental weight (g)	0.625 ± 0.02	0.656 ± 0.03	0.620 ± 0.03	0.584 ± 0.03	0.611 ± 0.04
Longitudinal axis (mm)	44.48 ± 1.3	45.57 ± 1.07	43.44 ± 1.5	41.29 ± 1.68	42.46 ± 0.66
Latero-lateral skull axis (mm)	9.39 ± 0.49	8.61 ± 0.28	8.74 ± 0.29	8.9 ± 0.49	8.35 ± 0.31
Anteroposterior head axis (mm)	12.84 ± 0.80	13.46 ± 0.29	12.88 ± 0.47	12.06 ± 0.55	12.89 ± 0.28
Tail length (mm)	11.65 ± 0.52	12.27 ± 0.27	10.89 ± 0.36	11.36 ± 0.52	11.56 ± 0.25
Placental efficiency	5.71 ± 0.72	5.72 ± 0.31	6.08 ± 0.43	4.64 ± 0.20	6.14 ± 0.51
Female fetuses					
	(n=7-8)	(n=9-11)	(n=12-13)	(n=7-9)	(n=10-12)
Fetal weight (g)	4.11 ± 0.45	3.721 ± 0.21	3.40 ± 0.30	2.31 ± 0.20*	3.55 ± 0.34
Placental weight (g)	0.615 ± 0.03	0.628 ± 0.03	0.567 ± 0.02	0.635 ± 0.09	0.648 ± 0.02
Longitudinal axis (mm)	43.47 ± 1.26	44.38 ± 0.92	45.64 ± 1.43	40.16 ± 1.39\$	41.28 ± 0.71
Latero-lateral skull axis (mm)	8.75 ± 0.32	8.56 ± 0.34	8.65 ± 0.40	8.31 ± 0.35	8.15 ± 0.32
Anteroposterior head axis (mm)	12.37 ± 0.51	13.0 ± 0.20	12.58 ± 0.40	12.19 ± 0.40	12.38 ± 0.19
Tail length (mm)	12.29 ± 0.69	11.86 ± 0.25	11.67 ± 0.62	11.48 ± 0.46	10.93 ± 0.41
Placental efficiency	6.99 ± 0.75	5.99 ± 0.34	6.28 ± 0.42	3.84 ± 0.28***\$\$	5.47 ± 0.48

Experimental groups were control (C); maximum load (M); constant-intensity resistance training (CIT); decreasing-intensity resistance training (DIT) and variable-intensity resistance training (VIT). Values are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by two-way ANOVA using Tukey's *post hoc* tests. * P<0.05, ** P<0.01 vs. C; # P<0.05 vs. ML; \$ P<0.05 \$\$ P<0.01 vs. CIT.

REFERENCES

- ABATE, D. T. et al. Exercise-training reduced blood pressure and improve placental vascularization in pregnant spontaneously hypertensive rats--pilot study. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 31, n. 6, p. 423-431, Dec 2012.
- ACOG. Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period: ACOG Committee Opinion, Number 804. **Obstet Gynecol**, v. 135, n. 4, p. e178-e188, 2020.
- ACOSTA-MANZANO, P. et al. Influence of a Concurrent Exercise Training Intervention during Pregnancy on Maternal and Arterial and Venous Cord Serum Cytokines: The GESTAFIT Project. **J Clin Med**, v. 8, n. 11, Nov 3 2019.
- ARROYO, J. et al. XIAP protein is induced by placenta growth factor (PLGF) and decreased during preeclampsia in trophoblast cells. **Syst Biol Reprod Med**, v. 60, n. 5, p. 263-273, Oct 2014.
- AVERY, N. D. et al. Fetal responses to maternal strength conditioning exercises in late gestation. **Can J Appl Physiol**, v. 24, n. 4, p. 362-376, Aug 1999.
- BHATTACHARJEE, J. et al. Physical activity differentially regulates VEGF, PlGF, and their receptors in the human placenta. **Physiol Rep**, v. 9, n. 2, p. e14710, Jan 2021.
- BØ, K. et al. Exercise and pregnancy in recreational and elite athletes: 2016 evidence summary from the IOC expert group meeting, Lausanne. Part 1—exercise in women planning pregnancy and those who are pregnant. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 10, p. 571, 2016.
- CAMERON, N.; DEMERATH, E. W. Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. **Am J Phys Anthropol**, v. Suppl 35, p. 159-184, 2002.
- CHAE, S. A.; SON, J. S.; DU, M. Prenatal exercise in fetal development: a placental perspective. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 11, p. 3058-3071, 2022/06/01 2022.
- CHAU, K.; HENNESSY, A.; MAKRIS, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. **J Hum Hypertens**, v. 31, n. 12, p. 782-786, Dec 2017.
- CHEN, Y. Y. et al. Increased ubiquitination and reduced plasma membrane trafficking of placental amino acid transporter SNAT-2 in human IUGR. **Clin Sci (Lond)**, v. 129, n. 12, p. 1131-1141, Dec 2015.
- CLAPP, J. F., 3RD. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 110 Suppl 1, p. S80-85, Sep 22 2003.
- CLAPP, J. F., 3RD et al. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 6, p. 1484-1488, Dec 2000a.

CLAPP, J. F., 3RD et al. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 142-147, Jan 2002.

CLAPP, J. F., 3RD et al. Portal vein blood flow-effects of pregnancy, gravity, and exercise. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 1, p. 167-172, Jul 2000b.

FRAGOSO, J. et al. Maternal physical activity-induced adaptive transcriptional response in brain and placenta of mothers and rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**, v. 11, n. 2, p. 108-117, Apr 2020.

GLUCKMAN, P. D.; BUKLIJAS, T.; HANSON, M. A. Chapter 1 - The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept: Past, Present, and Future. In: ROSENFELD, C. S. (Ed.). **The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease**. Boston: Academic Press, 2016. p.1-15. ISBN 978-0-12-801383-0.

GOULD, S. et al. Resistance Training Does Not Decrease Placental Blood Flow During Valsalva Maneuver: A Novel Use of 3D Doppler Power Flow Ultrasonography. **Sports Health**, v. 13, n. 5, p. 476-481, Sep-Oct 2021.

HARMON, A. C. et al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 6, p. 409-419, Mar 2016.

HAYWARD, C. E. et al. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? **Frontiers in Physiology**, v. 7, 2016.

JANZEN, C. et al. Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in human pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 1072-1078, Nov 2013.

KEMME, K. et al. An unstable social environment affects sex ratio in guinea pigs: an adaptive maternal effect? **Behaviour**, v. 146, n. 11, p. 1513-1529, 2009.

KONSTANTAKOU, P. et al. Dysregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: implications during pregnancy and beyond. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 30, n. 3, p. 284-293, Feb 2017.

KRAEMER, R.; HEMPSTEAD, B. L. Neurotrophins: novel mediators of angiogenesis. **Front Biosci**, v. 8, p. s1181-1186, Sep 1 2003.

KWON, E. J.; KIM, Y. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstet Gynecol Sci**, v. 60, n. 6, p. 506-519, Nov 2017.

LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. n. 2090-2735 (Electronic), 2012.

MA, J. et al. ELABELA alleviates syncytiotrophoblast hypoxia/reoxygenation injury and preeclampsia-like symptoms in mice by reducing apoptosis. **Placenta**, v. 106, p. 30-39, Mar 2021.

MANGWIRO, Y. T. et al. Maternal exercise alters rat fetoplacental stress response: Minimal effects of maternal growth restriction and high-fat feeding. n. 1532-3102 (Electronic), 2021.

MANGWIRO, Y. T. M. et al. Maternal exercise in rats upregulates the placental insulin-like growth factor system with diet- and sex-specific responses: minimal effects in mothers born growth restricted. **J Physiol**, v. 596, n. 23, p. 5947-5964, Dec 2018.

MANGWIRO, Y. T. M. et al. Exercise initiated during pregnancy in rats born growth restricted alters placental mTOR and nutrient transporter expression. **J Physiol**, v. 597, n. 7, p. 1905-1918, Apr 2019.

MEIRELES, A. L. F. et al. Maternal resistance exercise promotes changes in neuroplastic and epigenetic marks of offspring's hippocampus during adult life. **Physiology & Behavior**, v. 230, p. 113306, 2021/03/01/ 2021a.

MEIRELES, A. L. F. et al. Strength training during pregnancy influences hippocampal plasticity but not body development in neonatal rats. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 21, n. 2, p. 279-286, 2021b.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **J Physiol**, v. 572, n. Pt 1, p. 25-30, Apr 1 2006.

PIERCY, K. L. et al. The Physical Activity Guidelines for Americans. **Jama**, v. 320, n. 19, p. 2020-2028, Nov 20 2018.

RAGSDALE, H. B. et al. Regulation of inflammation during gestation and birth outcomes: Inflammatory cytokine balance predicts birth weight and length. **Am J Hum Biol**, v. 31, n. 3, p. e23245, May 2019.

RÄTSEP, M. T. et al. Impact of placental growth factor deficiency on early mouse implant site angiogenesis. **Placenta**, v. 35, n. 9, p. 772-775, Sep 2014.

ROMERO, R. et al. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. **Nutr Rev**, v. 65, n. 12 Pt 2, p. S194-202, Dec 2007.

ROSENFELD, C. S.; ROBERTS, R. M. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. **Biol Reprod**, v. 71, n. 4, p. 1063-1070, Oct 2004.

SAHAY, A. S.; SUNDRANI, D. P.; JOSHI, S. R. Neurotrophins: Role in Placental Growth and Development. **Vitam Horm**, v. 104, p. 243-261, 2017.

SAITOU, T. et al. Hypoalbuminemia is related to endothelial dysfunction resulting from oxidative stress in parturients with preeclampsia. **Nagoya J Med Sci**, v. 83, n. 4, p. 741-748, Nov 2021.

SILVESTRO, S. et al. Prenatal Hypoxia and Placental Oxidative Stress: Insights from Animal Models to Clinical Evidences. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 5, May 12 2020.

SIMMONS, D. G. 12 - Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. In: CROY, B. A.; YAMADA, A. T., *et al* (Ed.). **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Boston: Academic Press, 2014. p.143-161. ISBN 978-0-12-394445-0.

SKOW, R. J. et al. Effects of prenatal exercise on fetal heart rate, umbilical and uterine blood flow: a systematic review and meta-analysis. **Br J Sports Med**, v. 53, n. 2, p. 124-133, Jan 2019.

SOARES, M. J.; IQBAL, K.; KOZAI, K. Hypoxia and Placental Development. **Birth Defects Res**, v. 109, n. 17, p. 1309-1329, Oct 16 2017.

TAKAHASHI, Y. et al. Contributions of system A subtypes to α -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. **Amino Acids**, v. 49, n. 4, p. 795-803, Apr 2017.

THOMPSON, L. P.; TURAN, S.; ABERDEEN, G. W. Sex differences and the effects of intrauterine hypoxia on growth and in vivo heart function of fetal guinea pigs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 319, n. 3, p. R243-r254, Sep 1 2020.

TISSOT VAN PATOT, M. et al. Remodelling of uteroplacental arteries is decreased in high altitude placentae. **Placenta**, v. 24, n. 4, p. 326-335, Apr 2003.

WANG, D. et al. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 7, p. 1169-1179, Apr 1 2006.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 180-193, Jun 2005.

WINTERHAGER, E.; GELLHAUS, A. Transplacental Nutrient Transport Mechanisms of Intrauterine Growth Restriction in Rodent Models and Humans. **Front Physiol**, v. 8, p. 951, 2017.

APÊNDICE C – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

Artigos publicados

Revista: Life Sciences ISSN - 0024-3205

- Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype

Autores: Thaynan Raquel Dos Prazeres Oliveira, Raul Manhães-de-Castro, Jacqueline Maria Silva, Erika Vanesa Cadena-Burbano, Carolina Cadete Lucena Cavalcanti, Raquel Arruda Campos Benjamim, Amanda Braz Lago, Yves Tourneur, José Antonio-Santos, Raquel da Silva Aragão.

Acesso: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.011>

Revista: Nutritional Neuroscience ISSN - 1028-415X

- A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats

Autores: Erika Vanesa Cadena-Burbano , Carolina Cadete Lucena Cavalcanti , Amanda Braz Lago , Raquel de Arruda Campos Benjamim , Thaynan Raquel Dos Prazeres Oliveira , Jacqueline Maria Silva , Raul Manhães-De-Castro , Raquel Da Silva Aragão.

Acesso: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354958>

Revista: Behavioural Brain Research ISSN - 0166-4328

- High-caloric or isocaloric maternal high-fat diets differently affect young-adult offspring behavior in anxiety-related tests and offspring sensitivity to acute fluoxetine

Autores: Carolina Cadete Lucena Cavalcanti , Raquel Da Silva Aragão, Erika Vanesa Cadena-Burbano, Thaynan Raquel Dos Prazeres Oliveira, Jacqueline Maria Silva, Raquel de Arruda Campos Benjamim, Amanda Braz Lago, Eric Henrique Moraes Silva, Thuani Lamenha Costa, Raul Manhães-De-Castro.

Acesso: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113141>

Trabalhos apresentados em congressos e simpósios

Evento: XXXVI REUNIÃO ANUAL DA FESBE/ LVII CONGRESSO ANUAL SBFIS/ I CONGRESSO DOHaD BRASIL

- *Effects of different resistance training intensities during pregnancy on fetal growth.*

Autores: Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira, Débora Priscila Lima-Oliveira, Maira Beatriz Matos Paula, Rafael Victor Lira Brito, Alvaro Nascimento Barreto, José Antônio-Santos, Raquel Da Silva-Aragão.

- *Fluoxetine chronic administration enhances locomotor activity and increases anxiety-like behavior in young-adults rats from both maternal control and high fat diet.*

Autores: Riclenya Paulina Alves, Carolina Cadete Lucena Cavalcanti, Thamirys Luanna Silva, Erika Vanessa Cadena-Burbano, Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira, Álvaro do Nascimento Barreto, Raul Manhães-de-Castro, Raquel da Silva Aragão.

- *Effects of maternal high-fat diets on lipid profile and expression of myogenesis markers in offspring rats.*

Autores: Juliana Necker Ruver, Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira, Erika Vanessa Cadena-Burbano, Jacqueline Maria Silva, Carolina Cadete Lucena Cavalcanti, Severina Cássia Andrade Silva, Claudia Jacques Lagranha, Isabeli Lins Pinheiro, Raquel Da Silva Aragão.

Evento: 51st ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY/ 46th CONGRESS OF THE BRAZILIAN BIOPHYSICAL SOCIETY/ LAFEBs

- *Repercussions of different intensities of resistance training during pregnancy on maternal fasting glucose and biochemical profile.*

Autores: DÉBORA LIMA-OLIVEIRA, OLIVEIRA, T.R.P., PAULA, M.B.M., BRITO, R.V.L., ANTONIO-SANTOS, J, DA SILVA ARAGÃO, R.

Evento: SIMPÓSIO DE PROGRAMAÇÃO METABÓLICA MATERNA E DESFECHO FETAL

- Influência de dietas hiperlipídicas maternas com diferentes teores calóricos e da estimulação do sistema serotoninérgico (5-HT) sobre o comportamento no campo aberto na prole adulto-jovem.

Autores: CHAVES, WF; CAVALCANTI, CCL; CADENA-BURBANO, EV; OLIVEIRA, TRDP; SILVA, JM; LAGO, AB/ BENJAMIM, RAC; SILVA, EHM; MANHÃES-DE-CASTRO, R; PINHEIRO, IL; DA SILVA, ARAGÃO, R.

Prêmios

Evento: I CONGRESSO DOHaD BRASIL

Prêmio: Terceiro lugar no prêmio Professor Marco Antônio Barbieri

- *“Effects of different resistance training intensities during pregnancy on fetal growth”.*

Autores: Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira, Débora Priscila Lima-Oliveira, Maira Beatriz Matos Paula, Rafael Victor Lira Brito, Alvaro Nascimento Barreto, José Antônio-Santos, Raquel Da Silva-Aragão.

Acesso aos certificados: <https://bit.ly/3HCMezY>

ANEXO A – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 15 de abril de 2019

Ofício nº 18/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Raquel da Silva Aragão**
Centro Acadêmico de Vitória - Cav
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0059/2018

Certificamos que a proposta intitulada “Treinamento resistido durante a gestação associado ou não à dieta hiperlipídica materna: um estudo sobre as repercussões maternas, placentárias, fetais e do desenvolvimento motor da prole.” registrado com o nº 0059/2018 sob a responsabilidade de Prof.ª Raquel da Silva Aragão que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/03/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2019 a 01/01/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	334
Peso/Idade	220-250g reprodutores e gestantes e ao nascimento 50 – 70g filhotes de 21 dias
Sexo	Macho (246) fêmea (68)
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691