

MARCO ANTÔNIO FIDALGO AMORIM

**INDUÇÃO DE PROGRAMAÇÃO FETAL PELA
DESNUTRIÇÃO E PELO TREINAMENTO FÍSICO EM
RATOS: ESTUDO DE PARÂMETROS SOMÁTICOS E
BIOQUÍMICOS EM FÊMEAS E SUA PROLE**

RECIFE

2010

MARCO ANTÔNIO FIDALGO AMORIM

**INDUÇÃO DE PROGRAMAÇÃO FETAL PELA
DESNUTRIÇÃO E PELO TREINAMENTO FÍSICO EM
RATOS: ESTUDO DE PARÂMETROS SOMÁTICOS E
BIOQUÍMICOS EM FÊMEAS E SUA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carol Vírginia Góis Leandro, professora adjunta do Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco

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

RECIFE

2010

Amorim, Marco Antônio Fidalgo

Indução de programação fetal pela desnutrição
treinamento físico em ratos: estudo de parâmetros
físicos e bioquímicos em fêmeas e sua prole / Marco
Antônio Fidalgo Amorim. – Recife : O Autor, 2010.

127 folhas: il., fig., tab., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Dieta hipoproteica. 2. Exercício físico. 3. Re-
programação. I. Título.

613.2.038

CDU (2.ed.)

UFPE

613.2

CDD (20.ed.)

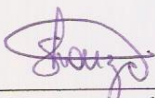
CCS2010-100

MARCO ANTÔNIO FIDALGO AMORIM

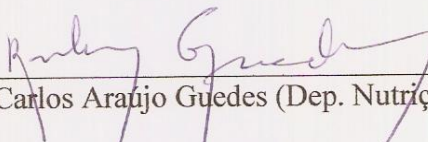
**INDUÇÃO DE PROGRAMAÇÃO FETAL PELA DESNUTRIÇÃO E
PELO TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS: ESTUDO DE
PARÂMETROS SOMÁTICOS E BIOQUÍMICOS EM FÊMEAS E
SUA PROLE**

Tese aprovada em 20 de abril de 2010

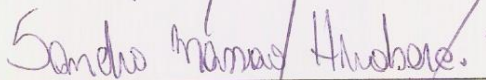
BANCA EXAMINADORA



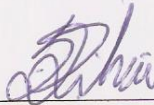
Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza (Dep. Anatomia - UFPE)



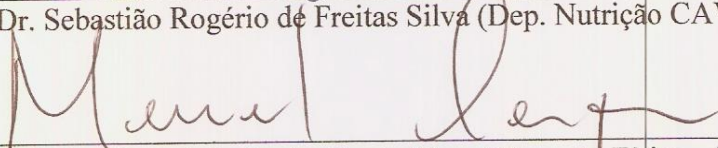
Prof. Dr. Rubens Carlos Araújo Guedes (Dep. Nutrição - UFPE)



Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara (Dep. Educação Física – UNICSUL)



Prof. Dr. Sebastião Rogério de Freitas Silva (Dep. Nutrição CAV - UFPE)



Prof. Dr. Manoel da Cunha Costa (Dep. Educação Física – UPE)

**Recife
2010**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à minha família **Luciana, Juliana e Fabiana**. Sem vocês, a maravilhosa estrada da vida e esta conquista não teriam o brilho que agora tem. As amo muito.

Aos meus pais, **Augusto e Rosa** (in memoriam), "eu me lembro!"

Aos meus irmãos **Ricardo, Rosana, Zezé, Luiz e Guto**, obrigado pela torcida, pela força e pelo carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS** por me conceder sua maravilhosa graça.

A Professora Carol Leandro,

Querida, gostaria de te agradecer imensamente pelo acesso ao conhecimento, pela maturidade científica e pela formação que me proporcionaste. Entretanto, nestes anos de convivência, não foi seu conhecimento ou sua sabedoria que mais me chamaram a atenção. Quero salientar o que mais tens de belo, sua preocupação pelas pessoas. Você, por trás desta "couraça Reichiana" tem seu lado suave, de flor, de rosa.

Querida, muito obrigado por toda paciência, atenção, confiança, desprendimento, apoio e, principalmente, pelo cuidado.

Não preciso dizer que tenho uma enorme admiração pela pessoa que és.

Grande beijo em seu coração.

Ao Professor Raul,

Ao fazer minha dedicatório para o senhor em minha dissertação de mestrado, lhe pedi obrigado por me aceitar como mais um de seus "filhos". Neste momento de reflexão, quero, além de reiterar aqui meus agradecimentos ao nosso "timoneiro", dizer que conseguiste provocar mudança na vida dos seus "filhos".

Vida longa ao nosso rei!

AGRADECIMENTOS

Aos meus estagiários **Filippe e Adriano**, sem vocês, com certeza, este sonho não teria sido alcançado. Tenho muito orgulho de vocês. Meu muito obrigado!

À família **NNI**, que esteja na "programação" de DEUS que continuemos a crescer, principalmente, como seres humanos.

A **Neci Nascimento e Lúcia Pires**, obrigado por toda a atenção e carinho.

Ao **Dr. França e "Seu" Paulino**, pela disponibilidade, pelas orientações e pela sabedoria.

Aos **funcionários e professores** do Departamento e da Pós-Graduação em Nutrição da UFPE que contribuíram imensamente para a conclusão do meu estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores **Rui Curi e Sandro Hirabara** e ao doutorando **Jarlei Fiamoncini** do Laboratório de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprendizagem durante o estágio.

Aos professores **Egberto Gaspar de Moura** e **Patrícia Lisboa**, as doutorandas **Ísis Trevenzoli** e **Mariana Sarto** e os demais colegas do Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro por toda a atenção dispensada e ensinamentos durante o estágio.

.

**"Ao anoitecer, pode vir o
choro, mas a alegria vem
pela manhã." (Salmo 30:5)**

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de fatores nutricionais e do treinamento físico no período perinatal sobre indicadores de crescimento somático e parâmetros bioquímicos da prole na idade adulta. Este estudo foi dividido em três etapas: (1) padronização de um protocolo de treinamento físico para ratas gestantes, submetidas ou não à dieta com restrição protéica, com base no consumo máximo de oxigênio para definição da intensidade do esforço; (2) avaliação murinométricas nos filhotes neonatos; e (3) avaliações de indicadores de crescimento somático e bioquímicos da prole na idade adulta. Ratos machos *Wistar* foram divididos de acordo com a manipulação de suas mães: não-treinados nutridos (NT-N_f - 17% caseína), treinados nutridos (T-N_f), não-treinados e desnutridos (NT-D_f - 8% caseína), treinados e desnutridos (T-D_f). O acompanhamento do peso corporal foi diário. No 1º dia pós-natal foi verificado número de filhotes nascidos por ninhada, peso da ninhada e peso ao nascer, eixo látero-lateral do crânio (ELLC) e ântero-posterior do crânio (EAPC), eixo longitudinal do corpo (EL) e comprimento da cauda (CC) de cada neonato. No 3º dia pós-parto, os encéfalos foram extraídos e pesados. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi avaliado aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade. Foram realizados testes de tolerância à glicose e à insulina aos 145 e 147 dias de vida, respectivamente. Aos 150 dias foram avaliadas a glicemia, colesterolemia, leptinemia e dimensões corporais. Fêmeas do grupo T+D apresentaram maiores valores de consumo de oxigênio de repouso quando comparadas ao grupo NT+D. A taxa de crescimento dos animais do grupo NT-D_f e T-D_f foi cerca de 50% menor do que os respectivos controles na lactação. A maior taxa de crescimento foi observada entre os dias 31 e 60 dia de vida com exceção do grupo NT-D_f que apresentou redução em relação ao grupo controle. Os animais do grupo NT-D_f e T-D_f apresentaram menor peso ao nascer quando comparados ao grupo NT-N. O ELLC e EAPC dos filhotes do grupo NT-D_f foram menores comparados ao grupo NT-N_f. Animais do grupo NT-D_f apresentaram deficit nos indicadores de crescimento em todos os períodos avaliados. Na idade adulta, estes animais apresentaram hiperglicemia, hipercolesterolemia, maior circunferência abdominal e níveis menores de leptina no plasma. Nos ratos do grupo T-D_f todas as alterações foram revertidas com exceção da concentração de leptina plasmática. Em conclusão, a desnutrição no período fetal e neonatal acarreta danos ao desenvolvimento dos sistemas fisiológicos e reduz o crescimento intrauterino e neonatal com possíveis repercussões na vida adulta, enquanto que o treinamento físico induz adaptação cardiorespiratória na mãe aumentando o fluxo feto-placentário de nutrientes e oxigênio e pode reverter e proteger o organismo contra as agressões provenientes de um insulto nutricional na fase precoce da vida.

Palavras-chave: Período crítico de desenvolvimento. Dieta hipoproteica. Exercício físico. Consumo máximo de oxigênio. Craniometria. Re-programação. Ratos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of nutritional factors and physical training in the perinatal period on indicators of somatic growth and biochemical parameters of the offspring in adulthood. This study was divided into three stages: (1) standardize a protocol of physical training for pregnant rats, with and without dietary protein restriction on the basis of maximum oxygen consumption to define the intensity of effort, (2) murinometric evaluations in newborn pups, and (3) assessments of indicators of somatic growth and biochemistry of the offspring in adulthood. Male Wistar rats were divided according to the manipulation of their mothers: untrained (NT-N_f - 17% casein diet), trained (T-N_f), untrained with low-protein diet (NT-D_f - 8% casein diet) and trained with low-protein diet (T-D_f). The pup's body weight was recorded daily. In the 1st postnatal day litter size, litter weight and birth weight, latero-lateral axis of skull (ELLC) and antero-posterior axis of skull (EAPC), longitudinal axis of the body (EL) and tail length (CC) was observed for each neonate. On the 3rd day postpartum, the brains were extracted and weighed. The Body Mass Index (BMI) was evaluated at 30, 60, 90, 120 and 150 days old. Glucose and insulin tolerance test were performed at 145 and 147 days of life, respectively. In the 150th day blood glucose, cholesterol, leptin and body dimensions were examined. Females in group T+D showed higher oxygen consumption at rest when compared to NT+D group. The growth rate of NT-D_f and T-D_f groups was about 50% lower than the controls in lactation. The highest growth rate was observed between the 31st and 60th day of life with the exception of NT-D_f which decreased compared to control group. The animals of NT-D_f and T-D_f groups had lower birth weight when compared to NT-N_f. The ELLC and EAPC of offspring of NT-D_f group were lower compared to control group. Animals of the NT-D_f group showed deficit in the growth indicators in all periods. In adulthood, these animals showed hyperglycemia, hypercholesterolemia, increased waist circumference and lower levels of leptin in plasma. In rats of T-D_f group all changes were reversed except for leptin concentration. In conclusion, malnutrition during fetal and neonatal periods causes damage to the development of physiological systems and reduces the intrauterine growth with possible consequences in adulthood, while physical training induces cardiorespiratory adaptation in the mother increases the fetal-placental flow of nutrients and oxygen and can reverse and protect the body against negative impact of the low-protein diet in early life.

Key-words: Critical period of development. Low-protein diet. Physical exercise. Maximal oxygen consumption. Craniometry. Re-programming. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

QUADRO 1	Composição da dieta padrão Labina [®]	47
QUADRO 2	Descrição do teste de desempenho máximo em esteira ergométrica	48
QUADRO 3	Caracterização do protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e a duração de cada sessão para cada uma das quatro semanas de treino (período pré-gestacional)	49
QUADRO 4	Caracterização do protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e a duração de cada sessão para cada uma das semanas de treino durante a gestação	49
QUADRO 5	Composição da dieta padrão Nuvilab CR1 [®]	50

FIGURAS

FIGURA 1	Esteira motorizada	47
FIGURA 2	Procedimento de treinamento físico em esteira ergométrica	51
FIGURA 3	Aparelho utilizado para avaliação do consumo de oxigênio de ratos	52
FIGURA 4	Representação esquemática dos grupos experimentais e das manipulações nutricionais	54
FIGURA 5	Representação esquemática das avaliações na 1ª etapa do experimento	55
FIGURA 6	Procedimento de avaliação dos eixos corporais e do comprimento da cauda de ratos neonatos	57
FIGURA 7	Representação esquemática das avaliações na 2ª etapa do experimento	58
FIGURA 8	Procedimento de avaliação das dimensões corporais de ratos aos 150 dias de idade	60
FIGURA 9	Procedimento de coleta e verificação da glicemia e colesterol séricos das mães e de ratos aos 150 dias de idade	61
FIGURA 10	Representação esquemática das avaliações na 3ª etapa do experimento	63

ARTIGO 2	FIGURA 1	Oxygen consumption and blood lactate concentration during maximal exercise test	70
	FIGURA 2	Body weight gain during gestation by untrained (NT, n=5), trained (T, n=5), untrained + lowprotein (NT+LP, n=5) and trained + lowprotein rats (T+LP, n=5)	74
	FIGURA 3	Resting oxygen consumption by untrained (n=5), trained (n=5), untrained + lowprotein (n=5) and trained + lowprotein rats (n=5) during gestation	75
	FIGURA 4	Body weight of offspring during growth	76

ARTIGO 3	FIGURA 1	Ganho de peso corporal durante as três semanas de gestação	93
	FIGURA 2	Peso ao nascer dos filhotes	93
	FIGURA 3	ELLC e EAPC dos filhotes	94

ARTIGO 4	FIGURA 1	Gain of body weight (A), fasting blood glucose (B) and relative daily food intake (C) during gestation by non-trained (NT, n=4), trained (T, n=4), non-trained + low protein (NT+LP, n=4) and trained + low protein dams (T+LP, n=4)	108
-----------------	----------	--	-----

FIGURA 2	Glucose tolerance test (GTT) (A) and insulin tolerance test (ITT) (B) of the offspring at 145d and 147d, respectively. Pups from untrained mothers (NT _p , n=8), trained (T _p , n=8), untrained + low protein (NT+LP _p , n=8) and trained + low protein (T+LP _p , n=8) animals	110
FIGURA 3	Fasting blood glucose and cholesterol of the offspring at 150d. Pups from untrained mothers (NT _p , n=8), trained (T _p , n=8), untrained + low protein (NT+LP _p , n=8) and trained + low protein (T+LP _p , n=8) animals	110
FIGURA 4	Plasma leptin concentration of the offspring at 150d. Pups from untrained mothers (NT _p , n=8), trained (T _p , n=8), untrained + low protein (NT+LP _p , n=8) and trained + low protein (T+LP _p , n=8) animals	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição das dietas à base de caseína	53
ARTIGO 2		
TABELA 1	Composition of the diets	68
TABELA 2	Treadmill training programme according to speed, inclination and duration of each session, for the 4 week period of training	71
TABELA 3	Treadmill training programme according to speed, inclination and duration of each session, for the 3 week of training during gestation	72
TABELA 4	Resting oxygen consumption and respiratory exchange ratio (RER) of untrained (NT, n=10) and trained rats (T, n=10)	74
TABELA 5	Growth rate of the offspring	76
ARTIGO 4		
TABELA 1	Body weight, % body weight gain, body length and abdominal circumference of the offspring at 30, 60, 90, 120 and 150 days old. Pups from untrained mothers (TN _p , n=8), trained (T _p , n=8), untrained+low protein (NT+LP _p , n=8), and trained + low protein (T+LP _p , n=8)	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG	Áreas sob as curvas de glicose	62
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	84
	Fatores neurotróficos derivados do cérebro	
CC	Comprimento da cauda	57
DBR	Dieta básica regional	89
DNA	Ácido desoxirribonucléico	30
EAPC	Eixo ântero-posterior do crânio	56
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	62
	Ácido etilenodiamino tetra-acético	
EL	Eixo longitudinal do corpo	56
ELLC	Eixo latero-lateral do crânio	56
FC_{max}	Frequência cardíaca máxima	32
GTT	Glucose tolerance test	61
	Teste de tolerância à glicose	
HIF	Hypoxia-inducible factors	34
	Fatores induzidos pela hipóxia	
IGF	Insulin-like growth factor	33
	Fator de crescimento similar á insulina	
IGF-BP	Insulin-like growth factor binding proteins	33
	Proteínas ligantes do fator de crescimento similar á insulina	
IMC	Índice de massa corporal	60
ITT	Insulin tolerance test	61
	Teste de tolerância à insulina	
Kitt	Velocidade constante de decaimento da glicemia	62
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	30
	Fosfenolpiruvato-carboxiquinase	
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase	29
	Fosfatidilinositol 3 quinase	
RAT	Relação circunferência abdominal / circunferência torácica	60
RER	Respiratory Exchange ratio	65
	Quociente respiratório	
RIA	Radio-immunoassay	100
RIE	Rádioimunoensaio	62
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro	34
TDM	Teste de desempenho máximo	46
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	34
	Fator de necrose tumoral-alfa	
VEGF	Vascular endothelial growth factor	34
	Fatores de crescimento endotelial vascular	
VO_2	Consumo de oxigênio	65
VO_{2max}	Consumo máximo de oxigênio	32

GRUPOS EXPERIMENTAIS

NT	Não-treinado
T	Treinado
NT-N	Não-treinado nutrido
NT-D	Não-treinado desnutrido
T-N	Treinado nutrido
T-D	Treinado desnutrido
NT	Non-trained
T	Trained
NT+LP	Non-trained + low protein
T+LP	Trained + lowprotein
NT-N _f	Filhotes de mães não-treinadas nutridas
NT-D _f	Filhotes de mães não-treinadas desnutridas
T-N _f	Filhotes de mães treinadas nutridas
T-D _f	Filhotes de mães treinadas desnutridas

PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS

EAPC	Eixo ântero-posterior do crânio
ELLC	Eixo látero-lateral do crânio
EL	Eixo longitudinal
CC	Comprimento da cauda
IMC	Índice de Massa Corporal
BMI	Body mass index
RAT	Relação abdômen/tórax
AC	Abdominal circumference Circunferência abdominal
TC	Toracic circumference Circunferência torácica
%BWG	Percentage body weight gain Percentual de ganho de peso corporal

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição?	24
3. OBJETIVOS.....	40
4. HIPÓTESES.....	42
5. MÉTODOS.....	44
1ª Etapa.....	46
5.1 Padronização do protocolo de treinamento físico para ratas gestantes com base no consumo máximo de oxigênio.....	46
5.1.1 Teste de desempenho máximo.....	46
5.1.2 Protocolo de avaliação do consumo máximo de oxigênio.....	49
5.1.2.1 Animais.....	50
5.1.2.2 Avaliação do consumo máximo de oxigênio.....	51
5.1.2.3 Manipulação da dieta das mães durante a gestação e lactação.....	52
5.1.2.4 Avaliação do peso corporal das ratas e da taxa de crescimento da prole.....	55
2ª Etapa.....	56
5.2 Avaliação de parâmetros somáticos em ratos neonatos.....	56
5.2.1 Animais.....	56
5.2.2 Avaliação murinométrica e extração dos encéfalos.....	56
3ª Etapa.....	59
5.3 Avaliação de indicadores da prole na idade adulta.....	59
5.3.1 Avaliação do consumo alimentar materno.....	59
5.3.2 Determinação do Índice de Massa Corporal (IMC), Índice de Lee e Relação abdômen/tórax (RAT) da prole.....	60
5.3.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos das mães e da prole.....	61
5.3.3.1 Verificação da glicemia e do colesterol sérico das mães e da prole.....	61
5.3.3.2 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT) da prole.....	61
3.3.4 Coleta do sangue da prole.....	62
3.3.5 Avaliação de parâmetros metabólicos do sangue da prole.....	62
5.4 Análise estatística.....	63
6. RESULTADOS.....	64
Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats?	65
Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos.....	82
Maternal moderate physical training re-programs the effect of a perinatal low-protein diet in adult offspring.....	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXOS.....	122

APRESENTAÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

Evidências epidemiológicas têm mostrado que a deficiência nutricional na infância aumenta o risco de obesidade e patologias associadas (hipertensão, diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia). A obesidade vem aumentando tanto nos países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento, a exemplo do Brasil. A evolução do estado nutricional da população brasileira passou por um processo de transição nas últimas décadas. Ocorreu um declínio da prevalência de desnutrição infantil e elevação da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos. Estabelece-se, dessa forma, um antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade, definindo uma das características marcantes do processo de transição nutricional.

A obesidade no adulto está associada a outros fatores de risco como a hipertensão, a hiperlipidemia e o diabetes tipo II. Parece que há alteração na sinalização da insulina e leptina em tecidos periféricos. Se esta alteração inclui receptores ineficientes para estes hormônios no músculo ou ainda sinais de transdução intracelulares permanece controverso. Experimentos sob a perspectiva da resposta hormonal e em nível celular podem fornecer importantes avanços no estudo das repercussões da desnutrição na vida adulta, dos mecanismos subjacentes ao surgimento da obesidade e o possível papel modulador do exercício físico. Estratégias de intervenção e tratamento incluindo dieta balanceada e atividade física regular são alvos de investimento de órgãos de saúde pública. Neste sentido, uma das estratégias propostas seria a adoção de um estilo de vida saudável como a prática de exercício físico regular.

Sendo assim, a pergunta condutora que norteou esta pesquisa é se o treinamento físico pode exercer um papel indutor de programação fetal, agindo como mecanismo de proteção, reduzindo os impactos deletérios da desnutrição materna sobre parâmetros murinométricos de crescimento da prole, indicadores bioquímicos e a expressão de leptina no músculo esquelético de ratos adultos submetidos à desnutrição no período precoce. O presente estudo teve como objetivo avaliar no rato as repercussões de fatores nutricionais e do treinamento físico no período perinatal sobre indicadores de crescimento somático, bioquímicos e na expressão de leptina no músculo esquelético da prole na idade adulta.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Dr^a. Naide Teodósio do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, tendo como orientadores a Prof^a. Dr^a. Carol Virgínia Góis Leandro e o Prof. Dr. Raul Manhães de Castro.

Parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e com o Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Borges da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

O estudo gerou 04 artigos científicos. Dois já foram publicados, um foi submetido e o último será enviado após suas correções. O primeiro, intitulado: **Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição?**, foi publicado como artigo de revisão na *Revista de Nutrição da PUCCAMP*, v. 22 n° 4; 2009. Esta revista é classificada com qualis B4 no comitê de Medicina II da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Neste estudo, que será utilizado como revisão da literatura para a tese, foi apresentada uma revisão sobre *Programming* e o papel da nutrição e da atividade física materna como possíveis indutores de programação fetal. O mecanismo sugerido pelo qual o exercício físico materno modula o crescimento fetal é através do possível aumento da disponibilidade de oxigênio e nutrientes via irrigação feto-placentária.

Os demais artigos serão apresentados como resultados da pesquisa e estarão dispostos em suas versões originais. O segundo artigo, com o título: **Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats?**, foi publicado como artigo original na revista: *Experimental Physiology*, v. 94 n° 8; 2009. O periódico possui qualis A2 no comitê de Medicina II da CAPES. Em resumo, neste artigo, foi validado um protocolo de treinamento físico de intensidade leve e moderada para ratas gestantes baseado no consumo de oxigênio. Ademais, foi demonstrado que este tipo de treinamento físico foi eficaz em aumentar o VO_{2max} das fêmeas e a taxa de crescimento de filhotes cujas mães foram desnutridas durante a gestação. O treinamento físico materno minimizou a agressão nutricional no período fetal e neonatal e interferiu positivamente sobre o aporte de oxigênio e nutrientes para o feto.

O terceiro artigo sob o título: **Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos**, foi submetido para publicação como artigo original na *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* (ANEXO – C). Este periódico tem classificação qualis B4 no comitê de Medicina II da CAPES. Em síntese, neste artigo, foi observado que o treinamento físico atenuou os efeitos da desnutrição materna sobre medidas de eixos cranianos de ratos neonatos. É possível que o exercício físico materno tenha favorecido a função placentária minimizando os efeitos da dieta hipoproteica no período crítico de desenvolvimento. Parece que o treinamento físico favoreceu o desenvolvimento embrionário e formação fetal, acarretando preservação das estruturas craniofaciais.

O quarto artigo intitulado: **Maternal moderate physical training re-programs the effect of a perinatal low-protein diet in adult offspring**, será submetido para publicação como artigo original na revista: *The Journal of Physiology* (ANEXO – D). Este periódico é classificado com qualis A1 no comitê de Medicina II da CAPES. Este artigo mostrou que fêmeas desnutridas apresentaram intolerância à glicose durante a gestação e seus filhotes crescimento menor e, na idade adulta, maior deposição de gordura abdominal e indicadores que apontam para resistência à insulina. Filhotes cujas mães treinaram e foram desnutridas durante a gestação e lactação tiveram estes efeitos revertidos. Parece que o treinamento físico materno foi capaz de re-programar o fenótipo metabólico induzido pela desnutrição perinatal.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA – ARTIGO DE REVISÃO

Revista de Nutrição

Print version ISSN 1415-5273

Rev. Nutr. vol.22 no.4 Campinas July/Aug. 2009

doi: 10.1590/S1415-52732009000400011

COMUNICAÇÃO COMMUNICATION

Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição?

Can maternal physical activity modulate the nutrition-induced fetal programming?

**Carol Góis Leandro¹; Marco Fidalgo Amorim²; Sandro Massao Hirabara³; Rui Curi⁴;
Raul Manhães de Castro²**

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Núcleo de Nutrição. R. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: C.G. LEANDRO: E-mail: <carolleandro22@yahoo.com.br>

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição. Recife, PE, Brasil

³Universidade Cruzeiro do Sul, Instituto de Ciências da Atividade Física e do Esporte, Departamento de Educação Física. São Paulo, SP, Brasil

⁴Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Existe considerável evidência para a indução de diferentes fenótipos em resposta às variações no ambiente fetal e neonatal. O aporte inadequado de nutrientes no período crítico do desenvolvimento está associado ao risco alto de doenças metabólicas na vida adulta, este fenômeno biológico é chamado de programação. A atividade física durante a gestação resulta em adaptações fisiológicas da mãe e no aumento da disponibilidade de nutrientes e oxigênio no espaço feto-placentário. Este trabalho tem como objetivo discutir os mecanismos da indução de programação fetal pela nutrição e o provável efeito modulador da atividade física durante a gestação. Foram utilizadas as bases de dados do *Medline Pubmed*, *Lilacs* e *Bireme*, com publicações entre 1990 até 2008. Os termos de indexação utilizados foram: *nutrition*, *fetal programming*, *gestation*, *physical activity*, *physical exercise*, *metabolism*. Em conclusão,

o aporte inadequado de nutrientes programa o aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta, enquanto que a atividade física durante a gestação aumenta a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, repercutindo positivamente no crescimento fetal e no peso ao nascer.

Termos de indexação: Atividade motora. Desenvolvimento fetal. Fenótipo. Gestação.

ABSTRACT

There is considerable evidence for the induction of different phenotypes by variations in fetal and neonatal environment. Undernutrition during this critical development period is associated with risk of metabolic disease in adult life; this biological phenomenon is termed programming. Physical activity during gestation results in maternal physiological adaptations and increased oxygen and nutrients in the fetoplacental compartment. The main goal of this work is to discuss the mechanisms of fetal programming induced by nutrition and the probable modulating effect of physical activity during gestation. Papers published between 1990 and 2008 listed in the Medline Pubmed, Lilacs and *Bireme* databases were used. The search keywords were: nutrition, fetal programming, gestation, physical activity, physical exercise, and metabolism. In conclusion, undernutrition can program the onset of metabolic diseases in adult life, while physical activity during gestation increases the availability of nutrients and oxygen for the fetus, thereby positively impacting fetal growth and birth weight.

Indexing terms: Motor activity. Fetal development. Phenotype. Pregnancy.

INTRODUÇÃO

Uma alimentação balanceada é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento do organismo. A falta ou a deficiência de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, durante a gestação e a lactação, tem repercussões a curto e longo prazo. A desnutrição no período fetal e na infância predispõe o indivíduo adulto a doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, ou aos fatores de risco associados, como a hipertensão, a intolerância à glicose e a hiperlipidemia¹. O organismo se adapta a um ambiente intra-uterino adverso, otimizando a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência. Se há aumento na disponibilidade de nutrientes após esse período crítico, o organismo pode apresentar alterações metabólicas associadas à obesidade e ao diabetes tipo II¹.

O mecanismo envolvido ainda está pouco esclarecido, mas pode estar associado a uma programação, na qual um estímulo ambiental aplicado durante o período crítico de desenvolvimento, tem efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos².

Outro mecanismo proposto é que um ambiente nutricional pode estimular uma seleção clonal adaptativa ou a proliferação e a diferenciação celulares, de forma que a quantidade e a proporção de células em um tecido sejam permanentemente afetadas. A epigenética estuda a interação entre o ambiente (fenótipo) e a expressão de genes (genótipo)³.

A identificação da regulação epigenética de expressão de genes como potencial mecanismo da indução de diferentes fenótipos pela nutrição materna durante o período crítico do desenvolvimento suscita o questionamento sobre a atuação de outros estímulos ambientais. Nesse sentido, é importante questionar acerca do estilo de vida materno, que inclui o engajamento em programas de atividade física. Os estudos citados neste texto indicam que a atividade física materna e o aporte energético induzem adaptações fisiológicas na gestação e atuam como reguladores crônicos e agudos da disponibilidade de oxigênio e substrato para o binômio mãe-filho. Parece que o principal fator que inicia a seqüência reguladora do crescimento é a disponibilidade de substrato e oxigênio vindos da mãe.

Diante da importância do estilo de vida materno para o desenvolvimento feto-placentário, levantou-se a hipótese sobre os mecanismos de programação fetal induzida pela atividade física e as repercussões na vida adulta. Da mesma forma, será que a atividade física materna pode modular a programação fetal induzida pela desnutrição? Para realização desta revisão, utilizaram-se as bases de dados *Medline Pubmed*, *Lilacs* e *Bireme*. Os termos de indexação utilizados foram: *nutrition*, *fetal programming*, *gestation*, *physical activity*, *physical exercise*, *metabolism*. Os artigos foram selecionados de acordo com a relevância do estudo para os tópicos estudados. Os artigos selecionados incluem estudos clássicos sobre programação fetal a partir de 1962. Para a discussão sobre nutrição e atividade física durante a gestação, foram utilizados artigos publicados nos anos de 1990 até 2008.

O QUE É PROGRAMAÇÃO FETAL?

O termo programação é utilizado para descrever o processo pelo qual um estímulo ou insulto, quando aplicado no período crítico do desenvolvimento, tem efeitos permanentes sobre a estrutura e as funções do organismo². A programação é um fenômeno biológico já bem conhecido. Por exemplo, em ratas, uma única dose de testosterona, aplicada no período crítico do desenvolvimento, programa o cérebro a desenvolver um padrão de comportamento masculino depois da puberdade, apesar de não alterar a função da pituitária e dos ovários⁴. O consumo de álcool por ratas gestantes causa redução de peso ao nascer e menor taxa de crescimento dos filhotes⁵. Este grupo de pesquisadores tem verificado em ratos que a exposição a fármacos durante o período crítico do desenvolvimento induz alterações na vida

adulta. Por exemplo, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso central, a administração crônica de citalopran, um anti-depressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina, reduziu o comportamento agressivo de ratos adultos⁶. O uso de outro anti-depressivo, a fluoxetina, durante a lactação, reduziu o comportamento depressivo de ratos adultos⁷. O tratamento neonatal com naloxane, um opióide endógeno, durante o período crítico de desenvolvimento dos testículos, aumenta a população das células de Sertoli e a produção de espermatozoides em ratos adultos⁸.

Em humanos, os estudos que envolvem a programação fetal geralmente associam a nutrição como estímulo indutor de programação fetal. A primeira evidência de programação veio de um estudo geográfico, em diferentes regiões da Inglaterra no ano de 1911, que associou a alta taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares ao baixo peso ao nascer⁹. Este elo foi subsequentemente demonstrado em estudos nos quais o crescimento durante a vida fetal e na infância foi registrado. O primeiro estudo foi realizado por Ravelli *et al.*¹⁰ com homens cujas mães passaram fome durante a gestação entre os anos de 1944-1945, a chamada *Dutch famine*. Os autores observaram que a exposição à fome no período da gestação resultou em jovens obesos aos 19 anos. Em Hertfordshire (Inglaterra), dentre 5654 homens, aqueles que apresentaram menor peso ao nascer tiveram maior taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares quando adultos¹¹. Ainda em Hertfordshire, foi observado que os homens diagnosticados como diabéticos apresentaram menor peso ao nascer e no primeiro ano de vida¹². No Brasil, tendo como principal fonte de informações três estudos transversais realizados nas décadas de 70, 80 e 90, observou-se transição nutricional referenciada no declínio rápido da prevalência de desnutrição em crianças e elevação, em ritmo mais acelerado, da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos¹³.

A nutrição como indutora de programação fetal

A relação entre a nutrição no período fetal e perinatal e a repercussão na vida adulta tem sido reconhecida há várias décadas. Em 1962, McCance¹⁴ manipulou o tamanho de ninhadas de forma que ratos de grandes ninhadas receberam menos leite materno, quando comparados aos seus pares de ninhadas menores. Após o período de lactação, ambos os grupos foram alimentados com dieta equilibrada. Os ratos provindos de grandes ninhadas apresentaram menor ganho de peso corporal e redução na taxa de crescimento. Foi assim demonstrado que o tamanho e a trajetória de crescimento de ratos estavam relacionados ao seu estado nutricional no período de lactação. Foi também demonstrado que a manipulação da dieta após a lactação não induziu qualquer efeito a longo prazo nos animais. Dessa forma,

surgiu a idéia de uma janela crítica temporal para o crescimento e o desenvolvimento, que pode ser programada pela nutrição¹⁴.

Uma vez reconhecido o papel dos nutrientes no crescimento e desenvolvimento, o estado nutricional de indivíduos, especialmente a desnutrição, se tornou o alvo dos estudos. Em 1964, Dobbing¹⁵ formulou a hipótese do período crítico do desenvolvimento, observando efeitos irreversíveis da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento do cérebro de ratos. De acordo com a ontogênese de cada fase (gestação, lactação ou primeira infância) e da espécie a ser estudada, a janela crítica do desenvolvimento pode se abrir e a falta ou o excesso de nutrientes pode induzir alterações permanentes na estrutura e na função de órgãos e sistemas. Em ratos, a desnutrição no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, que é o período de lactação, induz efeitos permanentes sobre o tamanho do cérebro, o número de neurônios, o comportamento, a aprendizagem e a memória^{16,17}. Estes pesquisadores têm observado que a desnutrição no período neonatal altera o crescimento somático, a resposta ao tratamento com anti-depressivos, o comportamento agressivo, o comportamento alimentar, as propriedades mecânicas do músculo esquelético, a morfologia do músculo cardíaco e o padrão de atividade locomotora de ratos adultos¹⁸⁻²².

Estudos experimentais sobre a desnutrição fetal têm demonstrado que fetos de mães submetidas à dieta hipoprotéica apresentam alterações metabólicas a curto e longo prazo²³⁻²⁵. Um modelo animal de estudo bem estabelecido é fornecer às mães uma dieta normoprotéica (com 18-20% de proteína, caseína) ou uma dieta hipoprotéica (7% a 8% de proteína, caseína), e no período de lactação ou no desmame, os filhotes começam a receber dieta padronizada²⁶⁻²⁸. Em um estudo com modelo de desnutrição protéica no período gestacional, foi verificado que a apoptose de células- β estava aumentada no pâncreas dos neonatos aos 14 dias de vida²⁹. Em ratos machos, a restrição de proteína na dieta alterou o desenvolvimento reprodutivo aos 70 dias de idade³⁰. Em ratos adultos (135 dias de idade) submetidos a uma dieta hipoprotéica (8% de caseína) durante o período pré e pós-natal, foi observada uma deficiência na estrutura dos rins e menor pressão arterial média, quando comparados aos seus pares normoprotéicos (20% de caseína)³¹.

O fígado de ratos adultos aos três meses de idade, cujas mães sofreram desnutrição gestacional, apresenta aumento no tamanho dos lóbulos. Estudos com perfusão *ex-vivo* têm mostrado resistência à ação estimuladora do glucagon sobre a liberação da glicose no fígado de filhotes adultos nessas condições. Este resultado foi acompanhado por redução de 80% na expressão de receptores hepáticos para o glucagon. Neste mesmo estudo, a insulina causou aumento da liberação de glicose hepática antes da redução normalmente esperada. Parece que

os receptores de membrana em hepatócitos são alvos para a programação, aumentando a expressão de receptores para a insulina em resposta à restrição dietética da mãe²⁶.

O músculo, principal local de consumo de glicose pós-prandial, tem também sido alvo de estudos. O músculo sóleo de ratos aos 15 meses de idade, e que foram submetidos à desnutrição fetal, apresenta menor sensibilidade à insulina, quando comparado ao de controles normoprotéicos. Os adipócitos de ratos (aos três meses de idade) submetidos à desnutrição na vida fetal apresentaram uma taxa elevada de consumo basal de glicose estimulado por insulina. Em paralelo, foi observado neste mesmo estudo, aumento na atividade da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), que participa diretamente dos efeitos metabólicos da insulina. Apesar do aumento da atividade do PI3K, os adipócitos de filhotes submetidos à desnutrição foram resistentes à ação anti-lipolítica da insulina²⁵.

Além do modelo de desnutrição por dieta hipoprotéica, há também o modelo de manipulação do percentual da dieta fornecida ao controle, geralmente entre 30 e 50%, de acordo com o consumo normal de ratos. Utilizando o modelo de restrição da dieta (30% da dieta consumida pelo controle *ad libitum*) durante a gestação e a recuperação da dieta na lactação, foi observado atraso no crescimento pós-natal e aumento na pressão arterial de ratos adultos³². Filhotes nascidos de mães alimentadas com 40% da dieta *ad libitum* fornecida ao grupo controle apresentaram taxa de crescimento menor, quando comparados ao grupo controle³³. Assim, não somente em termos qualitativos (quantidade de proteína), mas a quantidade de nutrientes fornecida durante o período crítico do desenvolvimento pode induzir alterações na taxa de crescimento do filhote.

A relevância dos dados provindos de estudos com animais para humanos permanece incerta. Contudo, em estudos epidemiológicos tem sido demonstrado que a desnutrição no período fetal ou neonatal pode programar o indivíduo para um aumento ou preservação dos estoques de gordura corporal ao longo da vida^{9,10}. Estudos recentes nos países em desenvolvimento demonstraram que os distúrbios no crescimento associados à desnutrição são paradoxalmente relacionados ao aumento do índice peso/altura³⁴. No Brasil, foi investigada a prevalência de obesidade e desnutrição em 535 famílias (2 411 indivíduos) de uma zona de baixa renda na cidade de São Paulo³⁵. Neste estudo, houve 30% de prevalência de desnutrição infantil. A prevalência de obesidade foi de 6,4% em rapazes e de 8,7% em moças. A associação entre sobrepeso e deficiência no crescimento foi de 5,8% em rapazes e 6,8% para moças, ocorrendo relação forte entre peso/altura infantil e sobrepeso no adulto³⁵. Resultados similares com crianças da zona rural e de periferias urbanas do Brasil foram publicados^{36,37}.

MECANISMOS PROPOSTOS

Os mecanismos envolvidos na programação incluem a interação entre o ambiente (fenótipo) e a expressão de genes (genótipo), que tem sido chamada de epigenética³. Muitos genes requerem condições especiais do ambiente para ganharem expressão fisiológica e comportamental, outros genes, provavelmente, nunca encontrarão condições adequadas de expressão³. Existem evidências de que o estado nutricional materno pode induzir alterações da expressão de genes pela metilação do DNA (ácido desoxirribonucléico) e da modificação de histonas (metilação e acetilação) do genoma fetal³⁸. Uma questão de interesse é o entendimento de como a memória destes eventos é estocada ao longo da vida, apesar de uma contínua divisão e diferenciação celulares.

O fenótipo do filhote que persiste ao longo da vida implica em alterações estáveis para a transcrição do gene^{3,39}. Embora o número de genes estudados ainda seja limitado, os efeitos estáveis da restrição de nutrientes sobre a transcrição têm sido demonstrados em alguns estudos^{3,38}. Nesse sentido é de ressalva o papel do *imprinting* genômico. Os *imprinted* genes são genes encontrados na placenta de mamíferos, marsupiais e sementes de plantas cuja expressão depende de sua origem parental. Em mamíferos, muitos destes genes estão envolvidos no crescimento fetal e são expressos tanto em tecidos do feto como na placenta³⁸.

É de interesse que alguns dos genes que são alterados seguindo estímulo ambiental pré e pós-natal são fatores de transcrição que afetam vias metabólicas³. Por exemplo, filhotes de mães submetidas à dieta hipoprotéica na gestação têm, aproximadamente, o dobro de atividade da enzima fosfenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK), uma enzima-chave da gliconeogênese, e aumento da atividade da enzima glicoquinase, uma enzima-chave da glicólise²⁵. Ademais, o perfil lipídico alterado em filhos de mães desnutridas na gestação parece ter relação com o aumento da expressão das enzimas acetil Co-A carboxilase e ácido graxo sintase no fígado²⁵. Tomados juntos, estes resultados demonstram um aumento no metabolismo hepático dos carboidratos na direção oposta daquela que seria induzida pela insulina.

A identificação da regulação epigenética de expressão de genes como potencial mecanismo da indução de diferentes fenótipos pela nutrição materna, durante o período crítico do desenvolvimento, suscita o questionamento sobre a atuação de outros estímulos ambientais. Nesse sentido, é importante questionar acerca do estilo de vida materno, que inclui o engajamento em programas de atividade física. Estudos epidemiológicos têm observado uma associação entre o estilo de vida ativo materno e as adaptações fisiológicas da gestação que regulam o crescimento feto-placentário⁴⁰⁻⁴².

Atividade física durante a gestação sobre o binômio mãe-filho

De acordo com o *American College of Obstetricians and Gynecologists*⁴³, mulheres com gestação de baixo-risco podem praticar exercício físico moderado e leve por cerca de 30 minutos por dia, todos os dias da semana. Contudo, ainda é difícil estabelecer recomendações de percentual de esforço físico durante a gestação, uma vez que a intensidade, o tipo e a duração do exercício físico são determinantes para as adaptações fisiológicas na mãe e as repercussões no filho. Ademais, é necessária a definição de termos utilizados como, por exemplo, atividade física, exercício físico e treinamento físico, para o entendimento da associação entre o estilo de vida da mãe e o desenvolvimento feto-placentário.

Atividade física durante a gestação

O termo atividade física se refere a qualquer movimento do músculo esquelético que demande gasto energético. Quanto ao nível de atividade física, o indivíduo pode ser classificado como ativo ou inativo, a depender da quantidade de calorias semanais gastas em um esforço físico⁴⁴. Assim, um indivíduo é considerado ativo quando se engaja em atividades físicas (caminhadas, *jogging*, andar de bicicleta, natação, atividades domésticas, atividades no trabalho, atividades de lazer e recreação) durante 30 minutos, levando a um dispêndio energético acima do metabolismo basal em torno de 1 500kcal/semana⁴⁴.

Em 1993, um estudo epidemiológico demonstrou que atividade física durante a gestação estava associada ao peso ao nascer do filho⁴⁵. Rao *et al.*⁴² avaliaram 797 gestantes da cidade de Pune na Índia quanto ao nível de atividade física (trabalho na agricultura, atividades domésticas e outras atividades), a partir de um questionário com pontuação para cada atividade. O resultado final foi expresso em gasto energético semanal (Kcal/sem). Neste estudo, foi observado que o nível de atividade física era inversamente relacionado ao ganho de peso materno a partir da 28ª semana de gestação⁴². Nos recém-nascidos, foi observado um menor peso ao nascer e redução em alguns parâmetros somáticos. Mais recentemente, Perkins *et al.*⁴⁴ avaliaram a relação entre o nível de atividade física aeróbia (por acelerometria), o ganho de peso durante a gestação e a altura para a taxa de crescimento fetal em 51 mulheres gestantes. Neste estudo, a correlação entre a atividade física e a taxa de crescimento fetal foi inversamente proporcional ($R=-0,42$, $p<0,05$). Crianças nascidas de mulheres no quartil mais alto de atividade física pesaram cerca de 608g menos que crianças nascidas de mães do quartil menor⁴⁴.

O engajamento em atividades de lazer e recreativas (natação e caminhada, três vezes por semana) está relacionado a efeitos positivos na mãe e no peso do filho ao nascer^{44,45}.

Estudos epidemiológicos relatam que a combinação entre atividade física regular e uma dieta equilibrada pode reduzir o risco de doenças na mãe, tais como: hipertensão, *diabetes mellitus* gestacional, desordem no desenvolvimento placentário, resposta insulina-glicose^{40-42,46}. Assim, mulheres que se exercitam regularmente deveriam continuar com o mesmo volume de atividade física, aumentando suas atividades de lazer e recreação em cerca de 20 a 30 minutos com uma frequência de 3 a 5 dias por semana⁴³. De acordo com o *American College of Obstetricians and Gynecologists*⁴³, os tipos de atividades que são recomendadas incluem: natação e bicicleta ergométrica (estacionária) por reduzirem as chances de lesão e impacto. Ademais, estudos recentes demonstraram que mulheres que já praticavam atividade física antes da gestação podem permanecer com a mesma duração e frequência semanal, contudo, recomenda-se evitar atividades que demandem esforço de alta intensidade⁴¹.

Exercício físico durante a gestação: alterações no crescimento feto-placentário

O termo exercício físico se refere a uma atividade física realizada sistematicamente. As adaptações fisiológicas associadas ao exercício físico dependem da intensidade, da duração e da frequência do esforço⁴⁷. O exercício físico pode ser classificado de acordo com a intensidade do esforço como: leve, moderado e intenso. Essa classificação toma como base a realização de alguns testes de esforço máximo para avaliar a concentração de lactato no sangue, o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), e/ou a frequência cardíaca máxima (FC_{max}). Em exercícios de intensidade leve e moderada, a concentração de lactato no sangue permanece estável (variando entre 2 e 4mmol/L). O VO_{2max} e a FC_{max} são os parâmetros fisiológicos mais comumente utilizados em estudos para referenciar a intensidade do esforço. Assim, um exercício leve geralmente se refere de 20 a 50% do VO_{2max} e da FC_{max} , um exercício moderado de 50-70% do VO_{2max} e da FC_{max} e o exercício intenso acima de 80% do VO_{2max} e da FC_{max} . Se o exercício físico é realizado regularmente é denominado de treinamento físico. Assim como o exercício físico, o treinamento físico pode ser classificado como leve, moderado e intenso⁴⁷.

Durante um exercício físico, a taxa de fluxo sanguíneo visceral diminui enquanto o fluxo sanguíneo aumenta para os músculos e a pele. Há uma diminuição de 50% do fluxo sanguíneo para a placenta em resposta a exercícios moderados e intensos. Os níveis voltam ao normal logo após o término do exercício⁴¹.

O efeito do exercício sobre parâmetros fisiológicos da mãe (fluxo de sangue placentário e conteúdo de oxigênio e nutrientes na artéria) varia com o tipo, a frequência, a duração e a intensidade do esforço, bem como o nível de aptidão física da mãe e o período da

gestação no qual o programa de exercício físico teve início⁴⁶. Estudos com humanos demonstram que, em gestantes não-exercitadas, o volume placentário na 20ª semana de gestação é cerca de 180mL, passando para 424mL na 40ª semana⁴⁸. Em gestantes exercitadas (60% do VO_{2max}), o volume placentário na 20ª semana de gestação é de cerca 255mL e na 40ª semana aumenta para 522mL⁴⁸. Uma carga de exercício físico moderado na primeira metade da gestação (60min, 5 dias por semana, 65% do VO_{2max}) estimula o crescimento placentário. Ao contrário, passar de um exercício físico de baixa intensidade (40% do VO_{2max}) na metade do período da gravidez, para um exercício físico intenso (>75% do VO_{2max}) no final da gestação induz a diminuição do peso corporal para a idade gestacional em cerca de 370g e o percentual de gordura de 12 para 8%⁴⁰.

Exercícios de intensidade mais leve apresentaram um menor aumento no volume placentário⁴⁰. Contudo, a esta intensidade de esforço, foi observada uma diminuição na concentração de glicose sangüínea e de insulina durante e após a sessão de exercício⁴⁶. Estes resultados fortalecem o papel benéfico do exercício físico na diminuição do risco de *diabetes mellitus* gestacional. Aliás, um estudo demonstrou que mulheres com diabetes gestacional e submetidas a uma dieta controlada e a exercício físico leve (20min, 3 vezes por semana, a 30% do VO_{2max}) apresentaram menor concentração de glicose sangüínea e hemoglobina glicosilada, quando comparadas a mulheres submetidas unicamente a dieta controlada⁴⁶.

O treinamento físico leve durante a gestação aumenta o volume plasmático materno de repouso, o volume de sangue no espaço intervilo, o débito cardíaco, a função placentária e a taxa de crescimento fetal⁴⁰. Há um aumento na disponibilidade de glicose no espaço placentário em resposta ao treinamento físico e isso vai repercutir no crescimento fetal⁴¹. O mecanismo de atuação inclui a regulação da síntese e liberação de peptídeos estimuladores do crescimento, como o fator de crescimento similar à insulina (IGF) dentro do compartimento fetal⁴¹. Quando a intensidade do esforço é aumentada, há uma redistribuição do fluxo sangüíneo na mãe para os músculos em movimento. Isso causa uma diminuição temporária da quantidade de substrato e oxigênio disponível para a placenta. Dessa forma, em resposta ao exercício físico intenso, vários tecidos fetais liberam peptídeos que tornam o crescimento fetal mais lento, a exemplo, as proteínas ligantes do fator de crescimento similar à insulina (IGF-BP)⁴⁸. Este efeito parece ser um mecanismo de proteção do feto que, se persistir, irá definir o tempo e o tipo de restrição do crescimento.

Pode o exercício físico durante a gestação induzir a programação fetal?

Os estudos sobre os efeitos a longo prazo do exercício físico durante o período de vida fetal ainda são escassos. Não há dados publicados com humanos e os modelos com animais avaliaram filhotes de ratos provindos de mães exercitadas até o período de desmame. Parnpiansil *et al.*⁴⁹ verificaram que os filhotes de ratas exercitadas durante a gestação apresentaram um aumento, após o nascimento, na expressão do RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) de fatores neurotróficos. Os autores correlacionaram este resultado ao aumento na habilidade de aprendizagem espacial (avaliado pelo teste de labirinto em "T"), quando comparados aos seus pares provindos de ratas não exercitadas.

Os estudos citados neste trabalho indicam que a atividade física materna e o aporte energético induzem adaptações fisiológicas na gestação e atuam como reguladores crônicos e agudos da disponibilidade de oxigênio e de substrato para o binômio mãe-filho. Parece que o principal fator que inicia a seqüência reguladora do crescimento é a disponibilidade de substrato e oxigênio provindos da mãe. O mecanismo subjacente inclui a liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o hormônio lactogênio placentário humano pela placenta, que regula suas concentrações de acordo com a disponibilidade de glicose e/ou outros fatores de crescimento feto-placentário⁴¹. O trofoblasto percebe a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, isso pode alterar a expressão de genes e a subsequente produção de múltiplos fatores supressivos ou estimuladores do crescimento.

Peptídeos reguladores adicionais incluem o sistema de fatores induzidos pela hipóxia (HIF), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esses peptídeos são liberados em resposta às alterações locais na tensão de oxigênio, que influencia a angiogênese e a taxa de crescimento vascular e as alterações adaptativas na rede de capilares placentários⁴⁰. Esse sistema funciona a partir de um *feedback* negativo no qual a tensão de oxigênio atua inversamente sobre o crescimento capilar⁴¹.

O balanço energético durante a gestação é um fator importante que afeta a relação entre nutrição materna e o peso ao nascer. Mulheres sub-nutridas de comunidades rurais dos países em desenvolvimento, como a Índia e o Brasil, têm cargas altas de atividade física (trabalho agrícola e atividades domésticas) e seus filhos apresentam baixo peso ao nascer^{42,50}. Extrema carga de trabalho também tem sido associada ao aumento da taxa de aborto e de nascimento de bebês prematuros⁴². Por outro lado, atividade física de baixa intensidade, e realizada sistematicamente, está associada ao aumento do peso ao nascer, mesmo em mulheres que passaram por privação dietética⁴⁶.

Assim, estudos que avaliem os efeitos a longo prazo da atividade física, associada ou não à nutrição durante a gestação, devem ser priorizados. Este grupo de pesquisadores tem utilizado o rato como modelo experimental, e os dados preliminares apontam para o efeito benéfico do treinamento físico moderado durante a gestação na taxa de crescimento (até os 90 dias de vida) e na aquisição do padrão de atividade locomotora dos filhotes. Nos filhotes de mães treinadas e desnutridas, os danos causados pela desnutrição foram atenuados (dados não publicados).

CONCLUSÃO

O ambiente influencia o crescimento e o desenvolvimento do filho. Vários estudos têm demonstrado o efeito do aporte inadequado de nutrientes durante a gestação e a ocorrência de doenças na vida adulta. O estilo de vida materno, representado pelo nível de atividade física, induz alterações no aporte de substratos e oxigênio no ambiente feto-placentário que repercutem no crescimento fetal e no peso ao nascer. Nesse sentido, é provável que a atividade física durante a gestação possa estar relacionada a alterações metabólicas na vida adulta. Da mesma forma, a atividade física também pode modular os efeitos da programação fetal induzida pela nutrição.

COLABORADORES

C.G. LEANDRO participou da elaboração do texto, da pesquisa em bases de dados e da redação final. M.F. AMORIM participou da revisão do texto e da pesquisa em bases de dados. S.M. HIRABARA, R. CURI e R.M. CASTRO participaram da revisão final do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Barker, DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007; 261(5):412-7.
2. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991; 156:38-50. Discussion 50-5.
3. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr.* 2007; 97(6):1036-46.
4. Angelbeck JH, DuBrul EF. The effect of neonatal testosterone on specific male and female patterns of phosphorylated cytosolic proteins in the rat preoptic-hypothalamus, cortex and amygdala. *Brain Res.* 1983; 264(2):277-83.

5. Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health*. 2000; 24(2):93-104.
6. Manhaes de Castro R, Barreto Medeiros JM, Mendes da Silva C, Ferreira LM, Guedes RC, Cabral Filho JE, *et al*. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(1):121-4.
7. Mendes-da-Silva C, Souza SL, Barreto-Medeiros JM, Freitas-Silva SR, Antunes DE, Cunha AD, *et al*. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002; 60(4):928-31.
8. Silva Jr. VA, Vieira AC, Pinto CF, Paula TA, Palma MB, Lins Amorim MJ, *et al*. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46(2):157-66.
9. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989; 298(6673):564-7.
10. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976; 295(7):349-53.
11. Barker DJ, Osmond C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the Second World War. *J Epidemiol Comm Health*. 1986; 40(1):37-44.
12. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, *et al*. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991; 303(6809):1019-22.
13. Filho MB, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública*. 2003; 19:S181-S91.
14. McCance RA. Food, growth, and time. *Lancet*. 1962; 2(7257):671-6.
15. Dobbing J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1965; 159:503-9.
16. Costa-Cruz RR, Amancio-dos-Santos A, Guedes RC. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Letter* 2006; 401(3):271-5.
17. Do Monte-Silva KK, Assis FL, Leal GM, Guedes RC. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. *Nutr Neurosci*. 2007; 10(3-4):187-94

18. Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira ESWT, Leandro CG, Deiro TC, *et al.* Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14(5):229-334.
19. Barros KM, Manhaes-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos RJ, Deiro TC, Cabral-Filho JE, *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci*. 2006; 9(1-2):99-104.
20. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci*. 2008; 27(6):1400-8.
21. Toscano AE, Amorim MA, Carvalho Filho EV, Aragao RS, Cabral-Filho JE, Moraes SR, *et al.* Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci*. 2008; 82(21-22):1131-6.
22. Toscano AE, Manhaes-de-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*. 2008; 24(3):270-8.
23. Berney DM, Desai M, Palmer DJ, Greenwald S, Brown A, Hales CN, *et al.* The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J Pathol*. 1997; 183(1):109-15.
24. Lesage J, Hahn D, Leonhardt M, Blondeau B, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J Endocrinol*. 2002; 174(1):37-43.
25. Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, *et al.* Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol*. 2003; 177(2):235-41.
26. Cottrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav*. 2008; 94(1):17-28.
27. Cripps RL, Archer ZA, Mercer JG, Ozanne SE. Early life programming of energy balance. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(Pt 5):1203-4.
28. Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins JL, Cripps RL, Chen JH, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(2):R494-500.

29. Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, *et al.* A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*. 1999; 140(10):4861-73.
30. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*. 2005; 563(Pt 1):275-84.
31. Hoppe CC, Evans RG, Moritz KM, Cullen-McEwen LA, Fitzgerald SM, Dowling J, *et al.* Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1):R462-9.
32. Woodall, SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res*. 1996; 40(3):438-43.
33. Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr*. 2004; 91(3):331-9.
34. Sawaya AL, Martins PA, Grillo LP, Florencio TT. Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev*. 2004; 62(7 Pt 2): S127-33.
35. Sawaya AL, Dallal G, Solymos G, Sousa MH, Ventura ML, Roberts SB, *et al.* Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. *Obes Res*. 1993; 3(Suppl 2):107s-15s.
36. Sichieri R, Moura AS, Godoy JL, Niero N, Matsumoto FN. Nutritional status of children and occupational categories of the family in a rural community of Parana, Brazil]. *Cad Saúde Pública*. 1993; 9(Suppl 1):28-35.
37. Florencio TT, Ferreira HS, Cavalcante JC, Luciano SM, Sawaya AL. Food consumed does not account for the higher prevalence of obesity among stunted adults in a very-low-income population in the Northeast of Brazil (Maceio, Alagoas). *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57(11):1437-46.
38. Sinclair SK, Lea RG, Rees WD, Young LE. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007; 64:425-43.
39. Smith FM, Garfield AS, Ward A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 113(1-4):279-91.

40. Clapp JF, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K, Lopez B. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(1):142-7.
41. Clapp JF. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. *Placenta.* 2006; 27(6-7):527-34.
42. Rao S, Kanade A, Margetts BM, Yajnik CS, Lubree H, Rege S, *et al.* Maternal activity in relation to birth size in rural India. The Pune Maternal Nutrition Study. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57(4):531-42.
43. ACOG Committee Opinion. Number 267, January 2002: exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(1):171-3.
44. Perkins CC, Pivarnik JM, Paneth N, Stein AD. Physical activity and fetal growth during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2007; 109(1):81-7.
45. Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L, *et al.* Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol.* 1993; 137(10):1105-14.
46. Clapp JF. Effects of Diet and Exercise on Insulin Resistance during Pregnancy. *Metab Syndr Relat Disord.* 2006; 4(2):84-90.
47. Leandro CG, Manhaes de Castro R, Nascimento E, Pithon-Curi TC, Curi R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2007; 13(5): 343-8.
48. Thomas DM, Clapp JF, Shernce S. A foetal energy balance equation based on maternal exercise and diet. *J R Soc Interface.* 2008; 5(21):449-55.
49. Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanez T, Kotchabhakdi N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett.* 2003; 352(1): 45-8.
50. Lima M, Ismail S, Ashworth A, Mies SS. Influence of heavy agricultural work during pregnancy on birth weight in North-East Brazil. *Int J Epidemiol.* 1999; 28(3):469-74.

Recebido em: 10/8/2007

Versão final reapresentada em: 8/8/2008

Aprovado em: 18/11/2008

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Padronizar um protocolo de treinamento físico de intensidade leve e moderada para ratas gestantes baseado no consumo de oxigênio.
- Analisar as repercussões do protocolo de treinamento físico e de fatores nutricionais sobre indicadores murinométricos de crescimento, homeostase glicêmica e concentração de leptina da prole na idade adulta.

3.2 Específicos

Em ratas nutridas ou desnutridas durante a gestação e lactação, submetidas ou não ao protocolo de treinamento físico, avaliar:

- o consumo de oxigênio;
- o ganho de peso;
- a glicemia e colesterolemia semanal.

Nos filhotes, avaliar:

- o peso dos filhotes ao nascer e indicadores de crescimento;
- o teste de tolerância à glicose e insulina aos 145 e 147 dias de vida;
- a glicemia e colesterolemia aos 150 dias de vida;
- a concentração plasmática de leptina aos 150 dias de vida.

HIPÓTESES

4. HIPÓTESES

- O treinamento físico age como mecanismo de proteção atenuando ou modulando os impactos deletérios da desnutrição materna sobre indicadores murinométricos de crescimento da prole;
- O treinamento físico reverte a hiperglicemia e hipercolesterolemia em ratos adultos submetidos à desnutrição no período perinatal.

MÉTODOS

5. MÉTODOS

Para realização do presente estudo, dividimos a sequência dos experimentos em três etapas. Inicialmente, padronizamos um protocolo de treinamento físico para ratas gestantes, submetidas ou não à dieta com restrição protéica, com base no consumo máximo de oxigênio para definição da intensidade do esforço (moderado, 65% do VO_{2max} , antes da gestação e leve, 40% do VO_{2max} , durante a gestação). Uma vez padronizado o protocolo de treinamento físico, realizamos avaliações murinométricas nos filhotes neonatos cujas mães foram submetidas à desnutrição e/ou treinamento físico durante o período perinatal. Finalmente, na terceira etapa dos experimentos, realizamos avaliações de indicadores de crescimento somático, bioquímicos e na expressão de leptina no músculo esquelético da prole na idade adulta.

1ª ETAPA

5.1 Padronização do protocolo de treinamento físico para ratas gestantes com base no consumo máximo de oxigênio

5.1.1 Teste de desempenho máximo

Inicialmente, foi realizado um teste de desempenho máximo (TDM) que consistiu de estágios de esforço progressivo em esteira ergométrica (Esteira Motorizada EP-131[®], Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 1). Foram utilizadas 6 ratas albinas primíparas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade de 60 dias e pesando 200±11 g, providas da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura e umidade e receberam água e dieta padrão de biotério (Ração Labina[®], Agribbrands Purina do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) (Quadro 1) *ad libitum*. Para o TDM, as ratas correram por 3 minutos a uma velocidade reduzida (0,3 km.h⁻¹) para a familiarização ao equipamento e aquecimento. A seguir, a velocidade da esteira ergométrica foi elevada em 0,3 km.h⁻¹ a cada 3 minutos. A inclinação da esteira foi mantida em 0° (Quadro 2). Para este teste, foram utilizados como base protocolos de outros estudos (Taylor e Weibel, 1981; Bedford et al., 1979; Brooks e White, 1978). Os testes eram interrompidos quando os animais se mostravam incapazes ou não desejavam continuar a correr sobre o tapete rolante da esteira. Para identificar as alterações metabólicas e funcionais durante o TDM, foi avaliada a concentração de lactato sanguíneo. A cada estágio de esforço, uma alíquota de sangue (0,1 mL) foi coletada da cauda dos animais. Para avaliação da concentração de lactato no sangue foram utilizadas capilares e tiras (BM Lactate Test Strips[®], Roche Diagnostics Ltd., Mannheim, Alemanha) e para leitura lactímetro (Accusport/Accutrend Portable Lactate Analyzer[®], Roche Diagnostics Ltd., Mannheim, Alemanha). Após o TDM, as ratas foram sacrificadas por dose letal de anestésico (3mL/100g de peso corporal - uretana a 12,5% e cloralose a 0,5% - Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA).



Figura 1. Esteira motorizada

Quadro 1. Composição da dieta padrão Labina®

Composição centesimal (*)	
Carboidrato	56,81%
Proteína	23,27%
Lipídios	4,24%
Enriquecimento/kg de ração (**)	
Vitamina A	28000UI
Vitamina D3	4400UI
Vitamina E	90UI
Vitamina K	7,0mg
Vitamina B12	44,0mcg
Vitamina B2	28,0mg
Ácido fólico	14,0mg
Biotina	0,2mg
Colina	2800mg
Niacina	242,0mg
Pantotenato de cálcio	100,0mg
Piridoxina	12,0mg
Tiamina	12,0mg
Iodo	2,0mg
Manganês	110,0mg
Ferro	180,0mg
Zinco	110,0mg
Cobre	30,0mg
Selênio	0,20mg
Cobalto	2,0mg
Antioxidante	150,0mg

Níveis de garantia (**)	
Umidade (max)	13,0%
Proteína bruta (min)	23,0%
Extrato etéreo (min)	4,0%
Matéria fibrosa (max)	5,0%
Matéria mineral (max)	10,0%
Cálcio (max)	1,3%
Fósforo (min)	0,85%

(*) Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, Departamento de Nutrição/UFPE

(**) Fonte: Agribands Purina do Brasil Ltda

Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal, pré-mix.

Quadro 2. Descrição do teste de desempenho máximo em esteira ergométrica

Estágio	Grau de inclinação	Velocidade (km.h⁻¹)	Duração (min)
1	0	0,3	3
2	0	0,6	3
3	0	0,9	3
4	0	1,2	3
5	0	1,5	3
6	0	1,8	3
7	0	2,1	3
8	0	2,4	3
9	0	2,7	3
10	0	3,0	3

A realização do TDM e a avaliação do lactato sanguíneo permitiram definir a velocidade e duração a ser utilizadas no protocolo de treinamento físico. O protocolo, durante o período pré-gestacional, consistiu de 4 semanas e 5 dias por semana (1ª sem=20min/dia, 2ª semana=50min/dia, 3ª semana=60min/dia, 4ª semana=60min/dia). A intensidade utilizada foi de aproximadamente 50% da velocidade máxima atingida no TDM. A primeira semana foi dedicada à adaptação. A seguir o protocolo foi dividido em estágios progressivos em cada sessão: (I) aquecimento (5 minutos); (II) zona intermediária (10 minutos); (III) zona de treinamento (30 minutos), e (IV) período final (5 minutos) (Quadro 3). A inclinação da esteira foi mantida em 0°.

Durante a gestação, o protocolo de treinamento físico foi modificado. A velocidade e duração dos estágios foram progressivamente diminuídas. O protocolo consistiu de 3 semanas e 5 dias por semana (1ª sem=50min/dia, 2ª semana=30min/dia, 3ª semana=20min/dia), com aproximadamente 30% da velocidade máxima atingida no TDM (Quadro 4).

Quadro 3. Caracterização do protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e a duração de cada sessão para cada uma das quatro semanas de treino (período pré-gestacional)

<i>Semanas</i>	<i>Velocidade (km.h⁻¹)</i>	<i>% de esforço relativo ao TDM (Velocidade máxima atingida = 1.8 km.h⁻¹)</i>	<i>Duração (min)</i>	<i>Duração total do treino (min)</i>
<i>Inicial (adaptação)</i>	0.3	16.7	5	20
	0.4	22.2	5	
	0.5	27.8	5	
	0.3	16.7	5	
<i>2ª semana</i>	0.4	22.2	5	50
	0.5	27.8	10	
	0.6	33.3	30	
	0.4	44.4	5	
<i>3ª semana</i>	0.4	22.2	5	60
	0.5	27.8	10	
	0.6	33.3	10	
	0.8	44.4	30	
	0.4	22.2	5	
<i>4ª semana</i>	0.5	27.8	5	60
	0.6	33.3	10	
	0.8	44.4	10	
	0.9	50.0	30	
	0.5	27.8	5	

Quadro 4. Caracterização do protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade e a duração de cada sessão para cada uma das semanas de treino durante a gestação

<i>Semana de gestação</i>	<i>Velocidade (km.h⁻¹)</i>	<i>% de esforço relativo ao TDM (Velocidade máxima atingida = 1.8 km.h⁻¹)</i>	<i>Duração (min)</i>	<i>Duração total do treino (min)</i>
<i>1ª semana</i>	0.4	22.2	5	50
	0.5	27.8	10	
	0.6	33.3	10	
	0.8	44.4	20	
	0.4	22.2	5	
<i>2ª semana</i>	0.4	22.2	5	30
	0.5	27.8	10	
	0.6	33.3	10	
	0.4	22.2	5	
<i>3ª semana</i>	0.3	16.7	5	20
	0.4	22.2	5	
	0.5	27.8	5	
	0.3	16.7	5	

5.1.2 Protocolo de avaliação do consumo máximo de oxigênio

A partir da definição da velocidade e duração a ser utilizadas no protocolo de treinamento físico foi realizada a avaliação direta do consumo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{max}}$ - $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e verificado as variações semanais para ajustar a intensidade durante os estágios.

5.1.2.1 Animais

Para a avaliação do consumo de oxigênio, foram utilizadas 20 ratas Wistar primíparas, com idade de 60 dias e pesando 180 ± 11 g, obtidas do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, e ciclo claro-escuro de 12/12 horas (claro das 18:00 às 06:00 h, escuro das 6:00 às 18:00 h), e livre acesso à água e dieta padrão de biotério (Nuvilab CR1[®], Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) (Quadro 5). Para adaptação ao ciclo invertido, todos os animais foram mantidos 15 dias no biotério, sem nenhum tipo de manipulação.

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - nº 23076.000312/2006-39 (Anexo – A).

Quadro 5. Composição da dieta padrão Nuvilab CR1[®]

Composição centesimal^(*)	
Carboidrato	52%
Proteína	21%
Lipídios	4%
Enriquecimento/kg de ração^(*)	
Vitamina A	12000UI
Vitamina D3	1800UI
Vitamina E	30,0mg
Vitamina K3	3,0mg
Vitamina B1	5,0mg
Vitamina B2	6,0mg
Vitamina B6	7,0mg
Vitamina B12	20,0mcg
Colina	600,0mg
Niacina	60,0mg
Ácido pantotênico	20,0mg
Ácido fólico	1,0mg
Biotina	0,05mg
Lisina	100,0mg
Metionina	300,0mg
Iodo	2,0mg
Manganês	60,0mg
Ferro	50,0mg
Zinco	60,0mg
Cobre	10,0mg
Selênio	0,05mg
Cobalto	1,50mg
Antioxidante	100,0mg

Níveis de garantia^(*)	
Umidade (max)	12,5%
Proteína bruta (min)	22,0%
Extrato etéreo (min)	4,5%
Matéria fibrosa (max)	8,0%
Matéria mineral (max)	10,0%
Cálcio (max)	1,4%
Fósforo (min)	0,8%

(*) Fonte: Nuvital Nutrientes S/A

Composição básica: milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, prémix vitamínico, mineral e aminoácidos.

5.1.2.2 Avaliação do consumo máximo de oxigênio

O protocolo de avaliação do $\text{VO}_{2\text{max}}$ foi de acordo com Leandro et al. (2007) e consistiu de estágios de esforço progressivo em esteira ergométrica. A avaliação direta do $\text{VO}_{2\text{max}}$ foi realizada em teste de desempenho máximo e no final de cada semana de treinamento físico do período pré-gestacional. As ratas foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos: não-treinado (NT, $n=10$) e treinado (T, $n=10$). O grupo T realizou uma corrida de baixa intensidade ($0,3 \text{ km.h}^{-1}$, durante 10 minutos) na esteira ergométrica adaptada para ratos (Millennium Inbramed®, Porto Alegre, RS, Brasil) (Figura 2), durante 3 dias consecutivos, para adaptação ao equipamento. A seguir, as ratas foram submetidas ao protocolo de treinamento físico padronizado. O grupo NT permaneceu em suas respectivas gaiolas.



Figura 2. Procedimento de treinamento físico em esteira ergométrica

O consumo de oxigênio (VO_2) foi avaliado através de um circuito aberto de calorimetria (Oxymax Deluxe System®, Columbus Instruments Inc., Columbus, OH, USA) (Figura 3). O sistema registra as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono através do volume de entrada e saída de ar de uma câmara. A diferença na concentração dos gases e as informações do fluxo foram empregadas nos cálculos do VO_2 , produção de dióxido de carbono (VCO_2) e produção de calor (kcal.h^{-1}). O ar foi ventilado de forma forçada para a câmara a uma taxa constante de $1,6 \text{ L/min}$. O sistema foi desenvolvido com sensores de gases estáveis e otimizados para concentrações de gases próximas às condições ambientais. As avaliações foram acuradamente realizadas com leitores que diferiram menos do que $0,1\%$ do ar de entrada e saída. A taxa de fluxo foi ajustada de acordo com o peso corporal dos animais para assegurar alterações na composição do gás expirado ($>0,05\%$). O fluxo foi controlado e calibrado antes de cada experimento (CO_2 off set = $0,001$; CO_2 gain = $0,65\%$; e O_2 = $21,2\%$). Para controlar toda a avaliação dos gases, um software (7400 Oxymax Single Chamber®,

Columbus Instruments Inc., Columbus, OH, USA) forneceu medidas calorimétricas específicas.

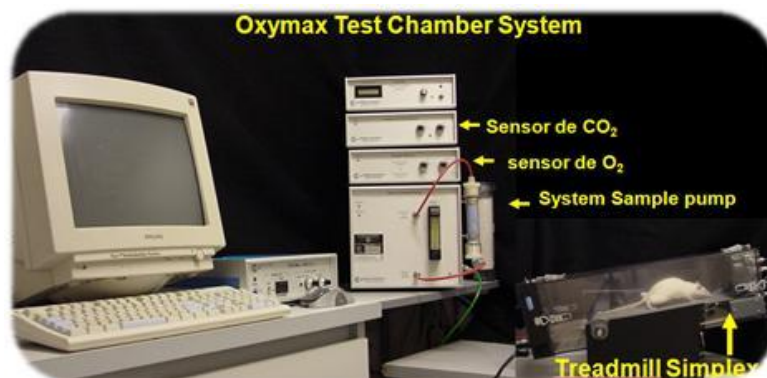


Figura 3. Aparelho utilizado para avaliação do consumo de oxigênio de ratos

Após quatro semanas de treinamento físico, as ratas dos dois grupos foram postas para acasalar com machos da mesma linhagem (2 ratas para cada 1 rato). Foi considerado como provável dia da concepção a visualização, em microscópio de luz, de espermatozóides em lâmina após coleta do esfregaço vaginal (Marcondes et al., 2002; Carballada et al., 1997). Após confirmação da gestação, as ratas foram alojadas individualmente e os animais do grupo T continuaram o treinamento físico por mais 3 semanas, até o 19º dia de gestação. O treinamento físico foi sempre realizado duas horas após as luzes se apagarem.

Durante a gestação, foi realizada a avaliação do VO_2 no repouso e nas as sessões de treinamento físico. Conforme dados obtidos no protocolo de avaliação do VO_{2max} , o treinamento físico antes da gestação apresentou intensidade moderada com aproximadamente 50% da velocidade máxima atingida no TDM e 65% do VO_{2max} e, durante a gestação apresentou intensidade leve, com aproximadamente 30% da velocidade máxima atingida em TDM e 40% do VO_{2max} .

5.1.2.3 Manipulação da dieta das mães durante a gestação e lactação

Imediatamente após a verificação da prenhez, metade das ratas de cada grupo (NT e T) foi submetida à dieta hipoprotéica (caseína a 8%). As demais ratas receberam dieta normoprotéica (caseína a 17%). As dietas confeccionadas foram isocalóricas com alteração apenas no conteúdo de proteína (Reeves et al., 1993) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas à base de caseína

Ingredientes	Quantidade /kg de dieta	
	Dieta hipoproteica (8% de caseína)	Dieta normoproteica (17% de caseína)
Caseína	79,30g	179,3g
Mix de vitamina*	10,00g	10,00g
Mix de sais minerais†	35g	35g
Celulose	50g	50g
Bitartarato de colina	2,5 g	2,5g
DL-metionina	3,0g	3,0g
Óleo de soja	70ml	70ml
Amido	750,2g	650,2g

* Mistura de vitaminas contendo (em mg.kg⁻¹ de dieta): retinol,12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico,140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzóico, 100; e biotina, 0,6.

† Mistura mineral contendo (em mg.kg⁻¹ de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200; e elementos-traço, 400(MnSO₄.H₂O, 98; CuSO₄.5H₂O, 20; ZnSO₄.7H₂O, 80; CoSO₄.7H₂O, 0,16; e KI, 0,32; com amido suficiente para completar 40g [por kg de dieta]).

Assim, foram formados quatro grupos experimentais: não-treinado nutrido (NT-N, caseína a 17%, n=5); não-treinado desnutrido (NT-D, caseína a 8%, n=5); treinado nutrido (T-N, n=5); treinado desnutrido (T-D, n=5) (Figura 4). Após o nascimento, somente os filhotes machos foram utilizados para as avaliações sobre o crescimento somático e foram mantidas ninhadas com seis animais. O número total de ratos utilizados para o experimento foi: filhotes de mães não-treinadas nutridas (NT-N_f, n=17); filhotes de mães não-treinadas desnutridas (NT-D_f, n=17); filhotes de mães treinadas nutridas (T-N_f, n=13); e filhotes de mães treinadas desnutridas (T-D_f, n=13).

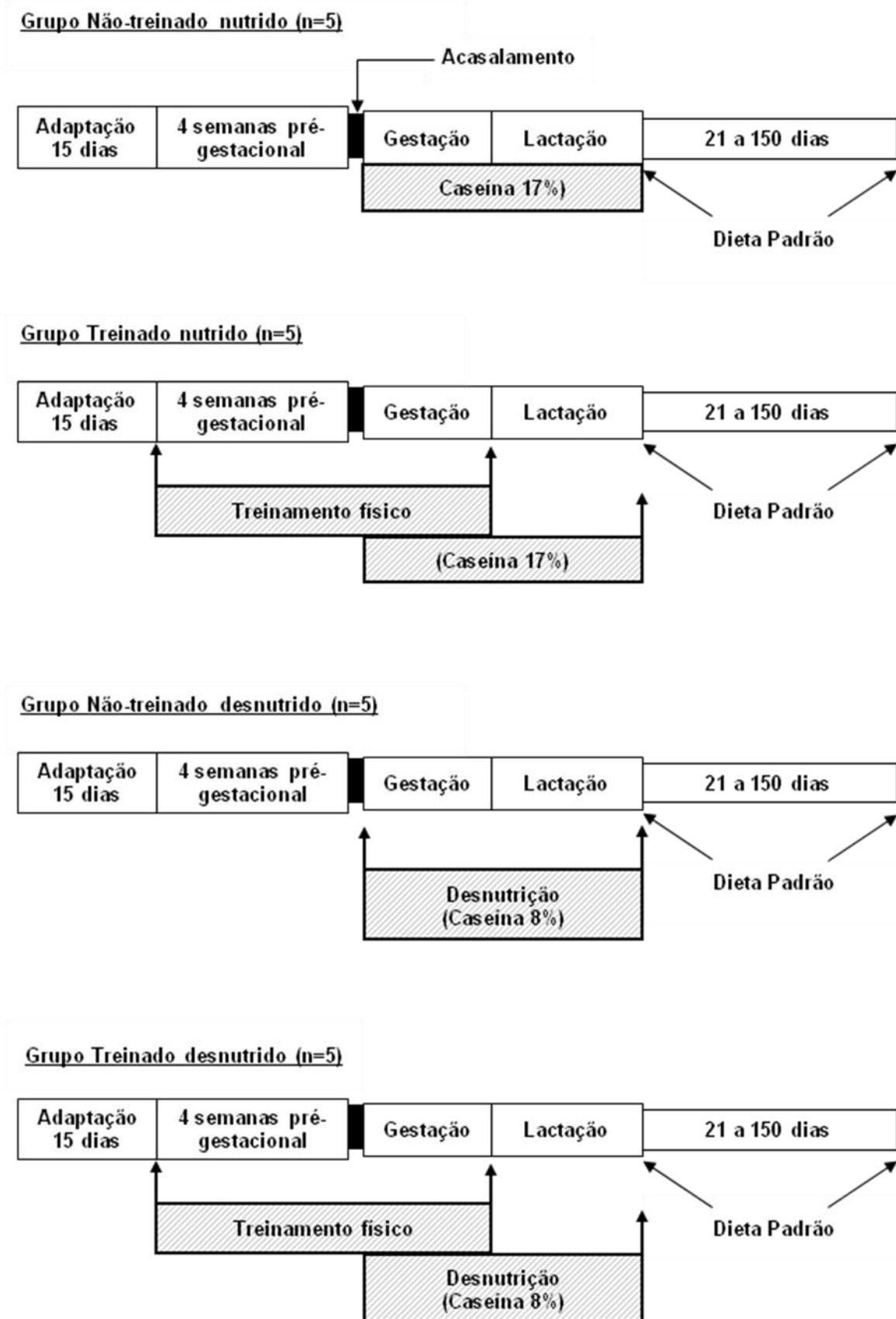


Figura 4. Representação esquemática dos grupos experimentais e das manipulações nutricionais

5.1.2.4 Avaliação do peso corporal das ratas e da taxa de crescimento da prole

O peso corporal (g) das ratas foi avaliado semanalmente no período pré-gestacional e diariamente durante a gestação e lactação. Os filhotes foram pesados, diariamente, até o 90º dia de vida. A manipulação foi sempre realizada duas horas após as luzes se apagarem, antes do treino. O peso foi registrado em balança eletrônica digital (Marte®, modelo S-4000, com sensibilidade de 0,1g, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil).

O percentual de ganho de peso corporal das mães foi calculado tendo como base o peso do 1º dia de avaliação, segundo a fórmula:

$$\% \text{ ganho de peso} = [\text{Peso do dia (g)} \times 100 / \text{Peso do 1º dia (g)}] - 100 \text{ (Bayol et al., 2004)}$$

A taxa de crescimento da prole foi referente ao valor do ganho de peso corporal diário de cada filhote, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de crescimento} = \text{Peso do dia (g)} - \text{Peso do dia anterior (g)} \text{ (Bayol et al., 2004)}$$

No nascimento, foi verificado o número de filhotes nascidos por ninhada, peso da ninhada (g) e peso corporal (g) de cada neonato.

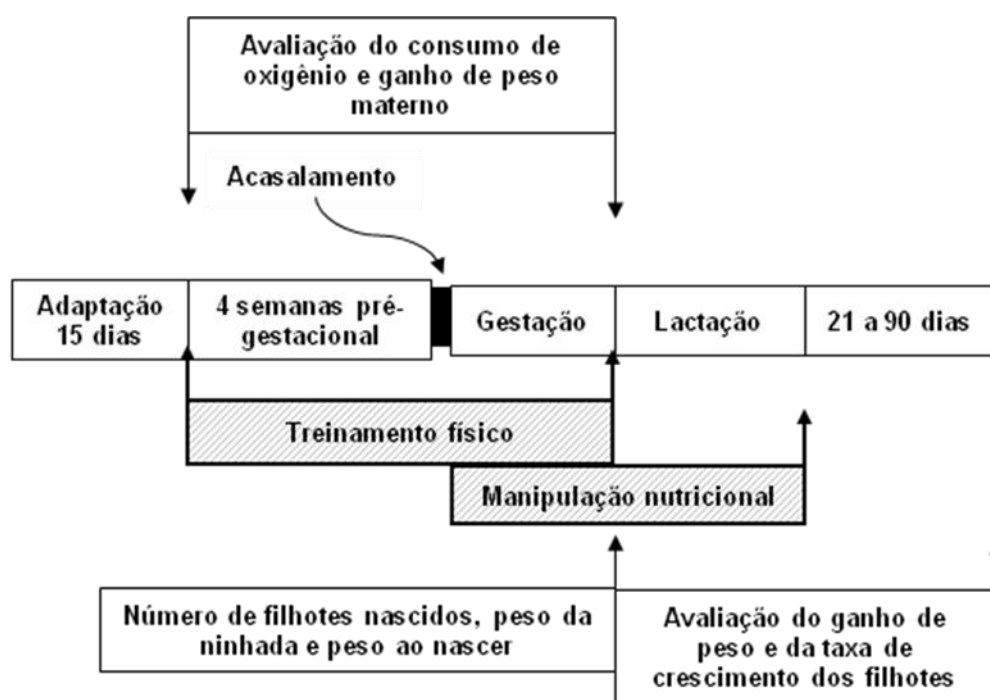


Figura 5. Representação esquemática das avaliações na 1ª etapa do experimento

2ª ETAPA

5.2 Avaliação de parâmetros somáticos em ratos neonatos

5.2.1 Animais

Para avaliar as repercussões de fatores nutricionais e do treinamento físico em ratos neonatos foram utilizadas 20 ratas Wistar primíparas, com idade de 60 dias e pesando 200 ± 11 g, da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclo claro-escuro de 12/12 horas (claro das 21:00 às 09:00 h, escuro das 9:00 às 21:00 h), e livre acesso à água e dieta padrão de biotério (Ração Labina[®] - Quadro 1). As fêmeas treinaram (Esteira Motorizada EP-131[®] - Figura 1) durante 8 semanas (5 semanas no período pré-gestacional e 3 semanas na gestação) e foram submetidas à desnutrição durante a gestação. Após o nascimento, somente os filhotes machos foram utilizados para as avaliações murinométricas e foram mantidas ninhadas com seis filhotes. O número total de ratos utilizados para o experimento foi: filhotes de mães não-treinadas nutridas (NT-N_f, n=25); filhotes de mães não-treinadas desnutridas (NT-D_f, n=25); filhotes de mães treinadas nutridas (T-N_f, n=25); e filhotes de mães treinadas desnutridas (T-D_f, n=25).

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - nº 23076.000312/2006-39 (Anexo – A).

O ganho de peso materno, o número de filhotes nascidos por ninhada, o peso da ninhada, o peso corporal ao nascer de cada neonato e a taxa de crescimento da prole foram avaliados conforme descrito nos experimentos realizados na 1ª etapa.

5.2.2 Avaliação murinométrica e extração dos encéfalos

No 1º dia pós-natal, foram determinadas as seguintes medidas dos filhotes (em milímetros - mm) de acordo com as técnicas murinométricas padronizadas por Barros et al. (2006) e Silva et al. (2005): a) eixo ântero-posterior do crânio (EAPC), linha média da extremidade do focinho à região externa da crista occipital; b) eixo látero-lateral do crânio (ELLC), linha perpendicular ao eixo longitudinal do crânio a qual divide ao meio os pavilhões auriculares; c) eixo longitudinal do corpo (EL), distância entre a extremidade do focinho e a

extremidade posterior do corpo; d) comprimento da cauda (CC), distância entre a extremidade posterior do corpo e a extremidade da cauda. As medidas foram realizadas com um paquímetro com acurácia de 0,01mm (Starret[®], Itu, SP, Brasil) (Figura 6).



Figura 6. Procedimento de avaliação dos eixos corporais e do comprimento da cauda de ratos neonatos. Fonte: Barros (1999)

No 3º dia após o nascimento, os neonatos foram sacrificados por decapitação e os encéfalos foram extraídos, lavados em solução salina (NaCl a 0,9%) e pesados em balança eletrônica (Marte[®], modelo AL 500, com sensibilidade de 0,001g, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil).

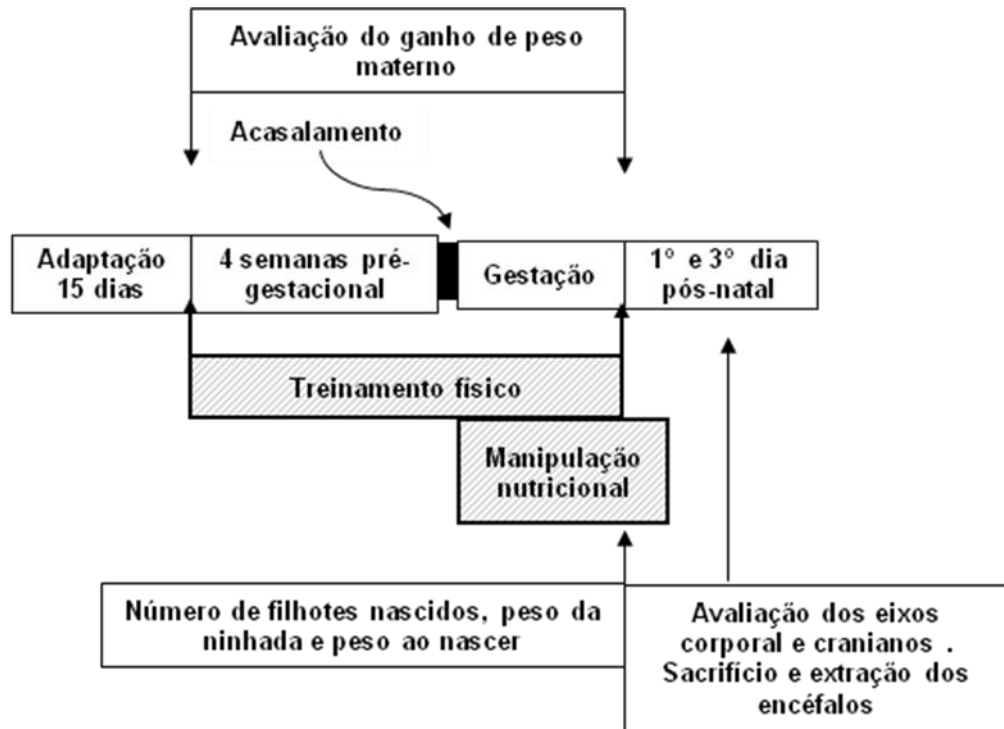


Figura 7. Representação esquemática das avaliações na 2ª etapa do experimento

3ª ETAPA

5.3 Avaliação de indicadores da prole na idade adulta

Para avaliar as repercussões da desnutrição e do treinamento físico na idade adulta, foram utilizadas 20 ratas Wistar primíparas, com idade de 60 dias e pesando 210 ± 14 g, da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições experimentais descritas nos experimentos realizados na 2ª etapa. As fêmeas foram submetidas ao protocolo de treinamento físico com 7 semanas (4 semanas no período pré-gestacional e 3 semanas durante a gestação - Amorim et al., 2009) e foram manipuladas nutricionalmente durante a gestação e lactação. Após o nascimento, foram mantidas ninhadas com seis filhotes machos. Para as avaliações, 1–2 filhotes machos de cada ninhada foram aleatoriamente escolhidos. O número total de ratos utilizados para o experimento foi: filhotes de mães não-treinadas nutridas (NT-N_f, n=8); filhotes de mães não-treinadas desnutridas (NT-D_f, n=8); filhotes de mães treinadas nutridas (T-N_f, n=8); e filhotes de mães treinadas desnutridas (T-D_f, n=8).

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - nº 008676/2007-48 (Anexo – B).

O ganho de peso materno, o número de filhotes nascidos por ninhada, o peso da ninhada, o peso corporal ao nascer de cada neonato e a taxa de crescimento da prole foram avaliados conforme descrito nos experimentos realizados na 1ª etapa.

5.3.1 Avaliação do consumo alimentar materno

O consumo alimentar (g) das ratas foi avaliado diariamente, durante a gestação e lactação, e foi obtido pela subtração do peso (Marte[®], modelo S-4000) da dieta ofertada e o peso da dieta restante após 24h, de acordo com a seguinte fórmula:

Consumo alimentar = Peso da ração (g) - Peso da ração do dia anterior (g)
(Lopes-de-Souza et al., 2008)

5.3.2 Determinação do Índice de Massa Corporal (IMC), Índice de Lee e Relação abdômen/tórax (RAT) da prole

O IMC e o Índice de Lee foram avaliados aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias de idade e a RAT foi avaliado somente aos 150 dias de idade. O peso (g) e a extensão corporal (cm) (Figura 8) foram utilizados para determinar os seguintes parâmetros:

IMC = Peso corporal (g) / Extensão naso-anal² (cm²) (Novelli et al., 2007)

Índice de Lee = Raiz cúbica do peso corporal (g) / Extensão naso-anal (cm)
(Novelli et al., 2007; Bernardis et al., 1968)

A circunferência torácica (cm), linha perpendicular ao eixo longitudinal na altura da décima terceira vértebra torácica, últimas costela e região esternal, e a circunferência abdominal (cm), maior circunferência entre a borda superior da crista ilíaca e a última costela (Figura 6), foram utilizadas para obter a relação abdômen/tórax através da seguinte fórmula:

RAT = Circunferência abdominal (cm) / Circunferência torácica (cm) (Novelli et al., 2007)

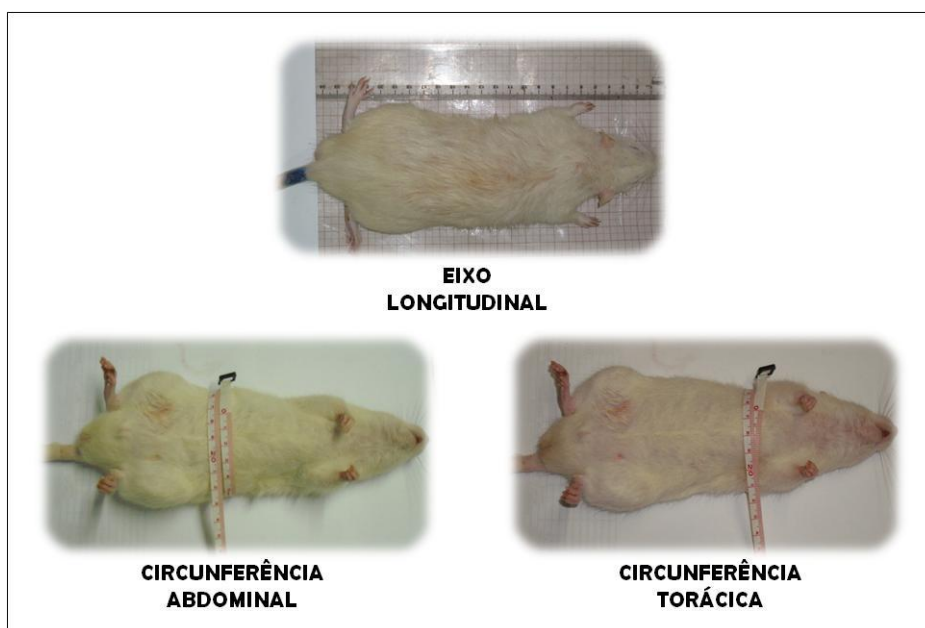


Figura 8. Procedimento de avaliação das dimensões corporais de ratos aos 150 dias de idade

5.3.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos das mães e da prole

5.3.3.1 Verificação da glicemia e do colesterol sérico das mães e da prole

Após jejum de 6 horas, os animais sofreram um corte na extremidade da cauda para coleta do sangue. A glicose e o colesterol séricos (mg.dL^{-1}) das fêmeas foram avaliados semanalmente durante o protocolo de treinamento físico. A primeira coleta foi realizada dois dias antes do início do treinamento físico, correspondendo ao tempo 0 (t_0). A última coleta foi no 20º dia de gestação. Nos filhotes, a glicemia e colesterolemia foram avaliadas aos 150 dias de idade. As concentrações de glicose sanguínea foram identificadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase/peroxidase e a leitura através de glicosímetro (Accu Check Advantage®, Roche Diagnostics Ltd., Mannheim, Alemanha) (Figura 9).



Figura 9. Procedimento de coleta e verificação da glicemia e colesterol séricos das mães e de ratos aos 150 dias de idade

5.3.3.2 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT) da prole

Teste de tolerância à glicose (GTT)

O teste foi realizado aos 145 dias de idade. Após jejum de 12 horas, foi feita a primeira coleta de sangue (tempo 0), através de corte na extremidade da cauda do animal, para retirada de uma alíquota de 10 μL . Em seguida, foi administrada, por via intraperitoneal, uma solução de glicose a 50% (Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda., Aparecida de Goiânia, GO,

Brasil) na dose de 1mg/1g de peso do animal, e outras amostras de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. Foi calculada a área sob a curva de glicose (ΔG), obtida pelos valores de glicemia nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, por meio do método trapezoidal (Le Floch et al., 1990; Mathews et al., 1990).

Teste de tolerância à insulina (ITT)

Aos 147 dias de idade e 48 horas após o GTT, foi realizado o teste. Após a primeira coleta de sangue (tempo 0) foi administrada, por via intraperitoneal, uma solução de insulina lispro (Humalog[®], Eli Lilly do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), na dose de 0,75mU/1g de peso do animal, e outras amostras de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. Com os valores de glicemia obtidos nos tempos 0, 30 e 60 minutos foi calculada a velocidade constante de decaimento da glicemia (Kitt), que expressa a queda da glicemia em %minuto, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Kitt} = 0,693/t^{1/2} \text{ (Le Floch et al., 1990; Lundbaek, 1962)}$$

5.3.4 Coleta do sangue da prole

Aos 150 dias de idade, após a avaliação da glicemia, colesterolemia e das dimensões corporais, os animais foram anestesiados com ketamina (0,25 mL/100g de peso corporal) e xilazina (0,25 mL/100g de peso corporal) e 5 mL de sangue foram coletados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) através de punção cardíaca. Após a coleta, as amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas (4.000 rpm, 10 min, 4°C). O plasma foi armazenado em tubos eppendorf e estocado a – 80°C para posterior análise.

5.3.5 Avaliação de parâmetros metabólicos do sangue da prole

Inicialmente, o plasma foi vortexado, para descongelamento e homogenização, e 900µL foram aliquotados para análise da leptina plasmática.

Leptina

Para determinar a leptina foi utilizado kit para radioimunoensaio (RIE) (Linco Research Inc., St Charles, MO, USA). Este kit de medidas possui limite mínimo de sensibilidade de 0,5ng.mL⁻¹ e amplitude de detecção de 0,5 a 50ng.mL⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em um único ensaio e o coeficiente de variação intraensaio foi de 2,9%.

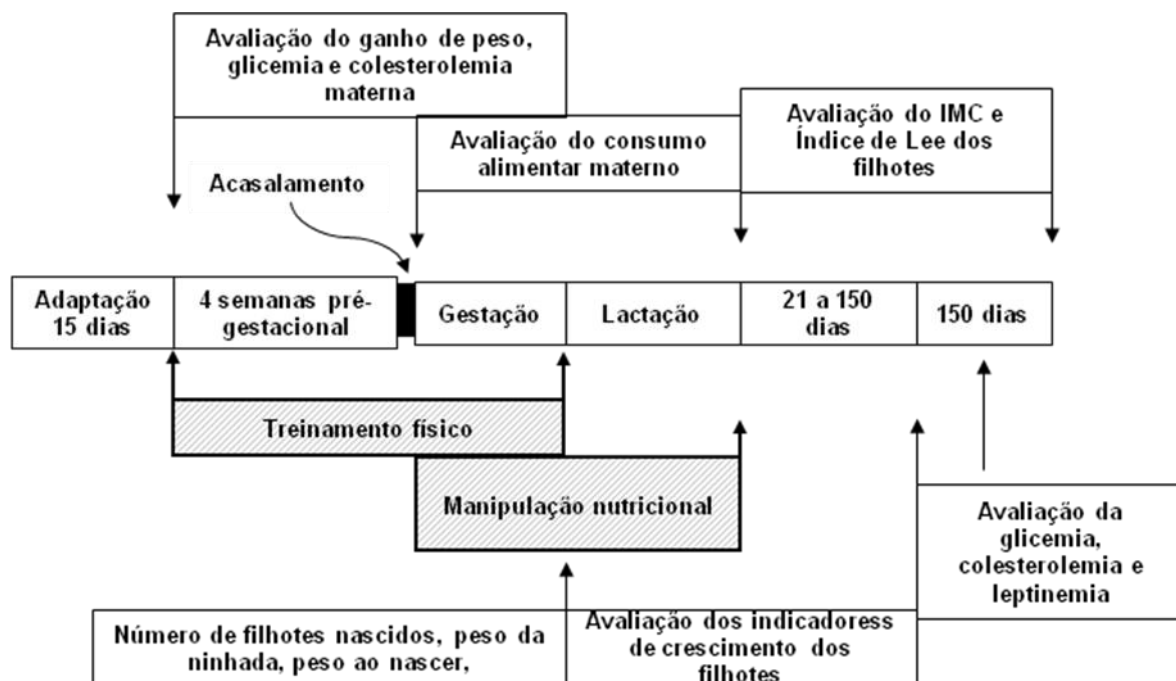


Figura 10. Representação esquemática das avaliações na 3ª etapa do experimento

5.4 Análise estatística

Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Quando os dados revelaram normalidade e homogeneidade de variâncias, para comparação de parâmetros das ratas durante o período pré-gestacional foi utilizado o t-test Student. Coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar ganho de peso na gestação com número de filhotes nascidos por mãe. Para comparação múltipla foi utilizada ANOVA two-way ou de medidas repetidas (RM) seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (EPM). O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0,05$) em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico Graphpad Prisma 4® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

6. RESULTADOS - ARTIGOS ORIGINAIS

Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats?

Marco Fidalgo Amorim¹, José Antonio dos Santos², Sandro Massao Hirabara³, Elizabeth Nascimento¹, Sandra Lopes de Souza⁴, Raul Manhães de Castro¹, Rui Curi⁵ and Carol Góis Leandro⁶

¹Department of Nutrition, ²Superior School of Physical Education and ⁴Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, Brazil³Institute of Physical Activity Sciences and Sports, Cruzeiro do Sul University, Brazil⁵Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Brazil⁶Department of Nutrition, Centro Academico Vitoria, Federal University of Pernambuco, Brazil

(Received 26 February 2009; accepted after revision 14 May 2009; first published online 29 May 2009)

Corresponding author C. G. Leandro: Rua Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50670-901, Departamento de Nutrição, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. Email: carolleandro22@yahoo.com.br

Abstract

A protocol of physical exercise, based on maximal oxygen uptake (VO_{2max}), for female rats before and during pregnancy was developed to evaluate the impact of a low-protein diet on oxygen consumption during gestation and growth rate of the offspring. Virgin female Wistar rats were divided into four groups as follows: untrained (NT, $n = 5$); trained (T, $n = 5$); untrained with low-protein diet (NT+LP, $n = 5$); and trained with low-protein diet (T+LP, $n = 5$). Trained rats were submitted to a protocol of moderate physical training on a treadmill over a period of 4 weeks (5 days week⁻¹ and 60 min day⁻¹, at 65% of VO_{2max} . At confirmation of pregnancy, the intensity and duration of the exercise was reduced. Low-protein groups received an 8% casein diet, and their peers received a 17% casein diet. The birth weight and growth rate of the pups up to the 90th day were recorded. Oxygen consumption VO_2 , CO_2 production and respiratory exchange ratio (RER) were determined using an indirect open-circuit calorimeter. Exercise training increased VO_{2max} by about 20% when compared with the initial values ($45.6 \pm 1.0 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). During gestation, all groups showed a

progressive reduction in the resting VO_2 values. Dams in the NT+LP group showed lower values of resting VO_2 than those in the NT group. The growth rate of pups from low-protein-fed mothers was around 50% lower than that of their respective controls. The T group showed an increase in body weight from the 60th day onwards, while the NT+LP group presented a reduced body weight from weaning onwards. In conclusion, physical training attenuated the impact of the low-protein diet on oxygen consumption during gestation and on the growth rate of the offspring.

Introduction

Fetal growth and development depend primarily on the embryonic genome, the maternal–placental–fetal unit, fetal hormones and maternal milieu, and adequate nutrient and oxygen supply to the developing fetus (Harding, 2001). Poor nutrition during early life leads to low birth weight and consequently changes in long-lasting phenotype. Perinatal undernutrition influences brain growth spurt, feeding behaviour, ontogeny of reflexes, skeletal muscle mechanical properties and locomotor activity in adult rats (Barros *et al.* 2006; Lopes de Souza *et al.* 2008; Toscano *et al.* 2008a,b; Orozco-Solis *et al.* 2009). Undernutrition also reduces fetal O_2 delivery, causing retardation in intrauterine growth and abnormalities of cardiovascular function in adult offspring (Barker, 1999a).

'Programming' is the term used to explain that during early ontogeny, the developing organism passes through a 'critical window' of sensitivity or plasticity, during which environmental factors generate long-lasting adjustments to the phenotype (Lucas, 1991). The environmental factors lead to transcriptional changes in proteins of metabolic and growth pathways (Burdge *et al.* 2007). Some of these changes are induced by epigenetic regulation that can also respond to several environmental stimuli, such as maternal physical activity.

Maternal lifestyle modulates several maternal physiological adaptations to pregnancy involved in feto-placental growth by enhancing nutrient and oxygen availability to the fetus (Clapp *et al.* 2004; Haakstad *et al.* 2007). However, the effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth are controversial. There are different responses according to the type of exercise, frequency, physical fitness of the mother, the point of time in the pregnancy when the exercise is carried out, and the duration and intensity of the exercise (Clapp *et al.* 2002; Clapp, 2003). Physical exercise is considered intense when the percentage of effort is higher than 75% $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Leandro *et al.* 2007). Intense physical exercise and high daily physical activity workload during pregnancy have been associated with low birth weight (Clapp *et al.* 2002; Rao *et al.* 2003). Studies in India have demonstrated

an inverse relationship between intense physical activity and birth weight in rural and urban women who had high levels of physical activity related to agricultural and domestic duties (Rao *et al.* 2003; Dwarkanath *et al.* 2007). In contrast, low to moderate physical exercise (40–70% of $\text{VO}_{2\text{max}}$) is associated with improved cardiorespiratory fitness, increased metabolic rate (reduction of body weight) and elevated lean body mass, all of which are recommend for aged, injured, obese and pregnant humans (Leandro *et al.* 2007). In women submitted to physical training, the rate of placental bed blood flow increases at rest, and more glucose and oxygen delivery to the placental site are observed (Clapp, 2003). An epidemiological study found that moderate physical exercise during pregnancy is associated with a 100–150 g increase in the birth weight (Hatch *et al.* 1993).

Energy expenditure during pregnancy can therefore be an important factor affecting the relationship between maternal nutrition and the size of the fetus at birth (Clapp *et al.* 2000). In the present study, a protocol of moderate physical exercise was developed, based on maximal oxygen consumption ($\text{VO}_{2\text{max}}$) for non-pregnant rats. The intensity of the exercise was classified as moderate, and the trained females were given exercise routines according to their physical fitness before pregnancy. At the confirmation of pregnancy, oxygen consumption was monitored weekly during the programme of physical training in order to control the low intensity of physical exercise. Our hypothesis is that exercise-induced physiological changes during gestation could attenuate or modulate the impact of a low-protein diet on the oxygen consumption during gestation and the growth rate of the offspring.

Methods

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil and followed the *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* (Bayne, 1996).

Animals

Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 60 days and weighing 180 ± 11 g (mean $\pm$ s.e.m.) were obtained from the Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. Female rats were maintained at a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with a controlled light–dark cycle (dark 06.00–18.00 h). Standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein, 4% lipids; Nuvilab CR1-Nuvital[®], Curitiba, Parana, Brazil) and water were given *ad libitum*.

Animals were randomly divided into two groups: untrained rats (NT, $n = 10$) and trained rats (T, $n = 10$). Trained rats were submitted to a training programme of moderate running over a period of 4 weeks (5 days week⁻¹ and 60 min day⁻¹) on a treadmill (Millennium Inbramed, Porto Alegre, Brazil) at a controlled intensity based on their VO_{2max}. Untrained rats were handled daily in order to reproduce the handling conditions to which trained rats were submitted. After the 4 week training period, the rats were mated (2 females for 1 male). The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception, day 0 of pregnancy. Pregnant rats were then transferred to individual cages. Half of the rats from each group received a 17% casein diet and the other half received an 8% casein isocaloric diet (low-protein group, LP) *ad libitum* (Table 1). Thus, two more groups were formed, as follows: untrained (NT, $n = 5$); trained (T, $n = 5$); untrained with low-protein diet (NT+LP, $n = 5$); and trained with low-protein diet (T+LP, $n = 5$). The exercise programme was maintained during gestation, with a progressive reduction of intensity until day 19 of gestation. The mother's body weight was determined weekly throughout the experiment. At the time of delivery, the litter size and birth weight of the pups were recorded. During the suckling period, the offspring were kept in groups of six pups. Offspring of low-protein-fed mothers remained on an 8% low-protein diet and the control groups received a 17% casein diet (Table 1). After weaning (on the 22th day of age), male offspring only were divided into four groups according to their mother's manipulations (NT_p, $n = 17$, pups from NT mothers; T_p, $n = 13$, pups from T mothers; NT+LP_p, $n = 17$, pups from NT-LP mothers; and T-LP_p, $n = 13$, pups from T-LP mothers). The offspring were kept in a collective cage (one cage per litter) and received standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein and 4% lipids; Nuvilab CR1-Nuvital®; Reeves *et al.* 1993) *ad libitum*. Body weight and growth rate were recorded up to the 90th day of life. Rats were killed by decapitation at 150th day of life.

Table 1. Composition of the diets

Ingredient	Amount for 1 kg of diet	
	Low-protein diet (8% protein)	Control diet (17% protein)
Casein	79,3 g	179,3 g
Vitamin Mix*	10 g	10 g
Mineral Mixture #	35 g	35 g
Cellulose	50 g	50 g
Choline Bitartrate	2,5 g	2,5 g
DL-Methionine	3,0 g	3,0 g
Soya oil	70 ml	70 ml
Corn Starch	750,2 g	650,2 g

* Vitamin mixture contained the following (in mg kg⁻¹ of diet): retinol, 12; cholecalciferol, 0.125; thiamine, 40; riboflavin, 30; pantothenic acid, 140; pyridoxine, 20; inositol, 300; cyanocobalamin, 0.1; menadione, 80; nicotinic acid, 200; choline, 2720; folic acid, 10; *p*-aminobenzoic acid, 100; and biotin, 0.6.

Mineral mixture contained the following (in mg kg⁻¹ of diet): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄·7H₂O, 200; and trace elements, 400 (MnSO₄·H₂O, 98; CuSO₄·5H₂O, 20; ZnSO₄·7H₂O, 80; CoSO₄·7H₂O, 0.16; KI, 0.32; with sufficient starch to bring to 40 g [per kg of diet]).

Protocol of the maximal effort test

Both trained and untrained animals were submitted to a VO_{2max} test according to the protocol suggested by Leandro *et al.* (2007). Briefly, the initial treadmill speed was 0.3 km h⁻¹. Every 3 min, the speed was increased by 0.3 km h⁻¹. The tests were stopped when the animals were unable to keep running on the treadmill, and the VO_{2max} was then determined. At every stage of effort, blood was collected from the tail vein and blood lactate was measured using an Accutrend Lactate testing system (Accutrend, Indianapolis, IN, USA). At a speed of 1.8 km h⁻¹, rats reached the maximal values of effort (VO₂ = 48.76 ± 3.3 ml kg⁻¹ min⁻¹ and blood lactate = 5.1 ± 1.5 mg dl⁻¹; Fig. 1A and B).

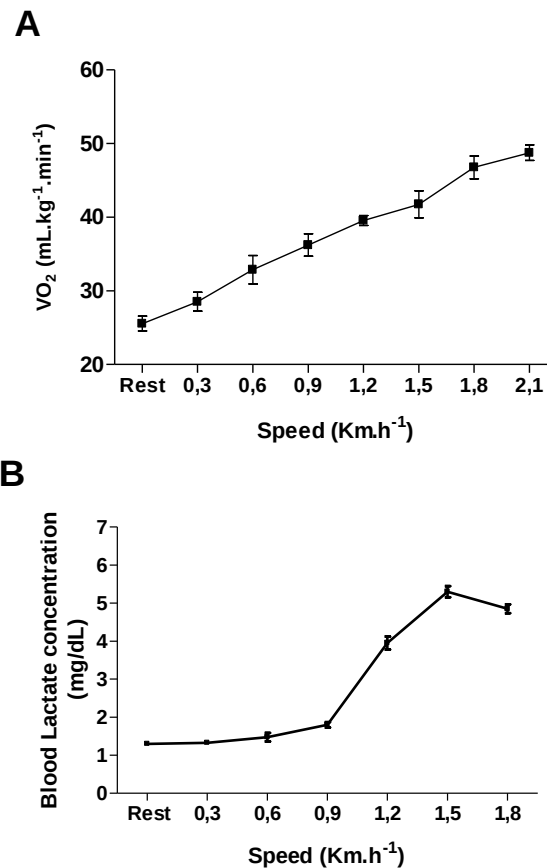


Figure 1. Oxygen consumption and blood lactate concentration during maximal exercise test. A, oxygen consumption (VO₂) during a maximal exercise test on a treadmill based, on the protocol for rats suggested by Leandro *et al.*(2007). B, blood lactate concentration during the test to evaluate VO_{2max}. All rats were submitted to the maximal exercise test ($n=20$). The values are presented as mean $\pm$ S.E.M.

Protocol of physical training

The VO_{2max} values of the rats assigned to the T group were used to adjust the 4 week programme of moderate running training. The training was effective for all animals in the trained group because of their homogeneity in terms of motor behaviour (Leandro *et al.* 2007). The speed of the treadmill (for each session of exercise) was adjusted according to the percentage of VO_{2max}. This adjustment was possible because oxygen consumption was measured during the different stages of the training programme. During the weeks of training, animals of the trained group performed physical exercise in an open-circuit calorimeter (Oxymax Deluxe System, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). The speed of the treadmill was modified according to the performance of animals, and their oxygen consumption reached 65% VO_{2max} (Table 2).

The first week was dedicated to the adaptation of the animals. During this week, the speed was very low and the duration of the exercise session was for 20 min per day (Table 2). In the second and subsequent weeks, the protocol was divided into four progressive stages: (1) warm-up (5 min); (2) intermediary (10 min); (3) training (30 min); and (4) cool-down period (5 min). The treadmill speed in the warm-up and cool-down periods was around 0.4 km h^{-1} (corresponding to around 40% of $\text{VO}_{2\text{max}}$). In the intermediary period, the animals ran two sets of 10 min, except in the second week when they ran one set only. Relative to the training period, in the second week the speed of the treadmill corresponded to 65% of $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Table 2).

During pregnancy, rats ran at a progressively reducing intensity of effort. The maximal effort test was not performed in pregnant rats. The adjustment of the speed of the treadmill was based on the last values of the $\text{VO}_{2\text{max}}$ test (in the fourth week). Pregnant rats ran at 40% $\text{VO}_{2\text{max}}$ until the 19th day of gestation (Table 3). There was no physical training during the lactation period.

Table 2. Treadmill training programme according to speed, inclination, and duration of each session, for the 4 week period of training.

Time (weeks)	Speed (km h^{-1})	Percentage of $\text{VO}_{2\text{max}}$ (means $\pm$ S.E.M)	Duration of each stages (min)	Total duration of each session (min)
Initial (adaptation)	0.3	36.1 ± 2.7	5	20
	0.4	38.7 ± 2.9	5	
	0.5	37.8 ± 1.9	5	
	0.3	35.7 ± 3.1	5	
2nd week	0.4	42.5 ± 1.7	5	50
	0.5	47.8 ± 3.1	10	
	0.6	57.3 ± 5.0	30	
	0.4	54.4 ± 2.4	5	
3rd week	0.4	32.4 ± 2.0	5	60
	0.5	41.8 ± 3.0	10	
	0.6	51.1 ± 2.8	10	
	0.8	64.0 ± 3.3	30	
	0.4	57.2 ± 3.4	5	
4th week	0.5	26.8 ± 1.7	5	60
	0.6	43.4 ± 3.9	10	
	0.8	49.1 ± 5.1	10	
	0.9	65.3 ± 4.7	30	
	0.5	57.8 ± 3.9	5	

Table 3. Training programme of running according to speed, inclination, and duration of each session for the 3 weeks of training during gestation.

Time (weeks)	Speed (km h⁻¹)	Percentage of VO_{2max} (means ± S.E.M)	Duration of each stages (min)	Total duration of each session (min)
1st week	0.4	52.9 ± 3.4	5	50
	0.5	57.8 ± 4.4	10	
	0.6	63.1 ± 1.4	10	
	0.8	66.4 ± 4.9	20	
	0.4	62.0 ± 2.6	5	
2nd week	0.4	42.0 ± 1.3	5	30
	0.5	47.8 ± 5.1	10	
	0.6	43.5 ± 5.7	10	
	0.4	42.1 ± 3.2	5	
3rd week	0.3	36.7 ± 1.8	5	20
	0.4	32.2 ± 2.9	5	
	0.5	32.8 ± 1.7	5	
	0.3	29.9 ± 2.6	5	

Resting VO₂ and respiratory exchange ratio (RER) measurements

The VO₂ and RER were measured using an indirect, open-circuit calorimeter. This system monitors oxygen concentration by volume at the inlet and outlet ports of a chamber through which a known flow of air is being forcibly ventilated. Air was drawn from the front end at a constant rate (2.5 l min⁻¹) and passed through a silica column to absorb water. The system was constructed with stable gas sensors optimized for sensing concentrations near ambient conditions. The measurement was accurately made from values that differed by as little as 0.1% from inlet to outlet. The flow rates were adjusted according to the weight of the animal to ensure that the changes in the composition of the expired gases were more than 0.05%. The flowmeter was controlled and calibrated with gases of known concentrations (CO₂ offset = 0.001; CO₂ gain = 0.65%; and O₂ = 21.2%).

Measurements were performed at approximately 10.00 h after 3 h of fasting. After a 10 min stabilization period of the gases in the interior of the chamber, O₂ and CO₂ consumptions and RER were determined every 1 min during a 15 min period. Controlling software (7400 Oxymax Single Chamber, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) provided specific calorimetric measurement and recording of VO₂ and RER values minute by minute. The VO₂ and RER of rats from all groups were recorded every week before mating. During pregnancy, VO₂ and RER were recorded on the 2nd, 10th and 19th days.

Offspring body mass and growth rate

Body weight of the pups was recorded daily throughout the experiment. Body weight gain was calculated as follows:

Growth rate was calculated by the gain of grams per day (g day^{-1} ; Bayol *et al.* 2004).

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ s.e.m. Student's unpaired *t* test was used to compare groups (trained and untrained). One-way ANOVA was used to examine intergroup differences. *Post hoc* differences among the means from experimental groups were determined by Tukey's test. Pearson's correlation coefficient was used to correlate body weight and $\text{VO}_{2\text{max}}$. For measurements of body weight and growth rate, two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test were used. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

The protocol of the maximal effort test was repeated every week (once a week, on a non-training day) in order to adjust the exercise intensity in the zone of training at around 50–65% of the $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Table 2). From the third week on, trained animals consistently increased the rate of maximal oxygen consumption with respect to the speed for each week (first week, $45.6 \pm 2.7 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; second week, 47.9 ± 3.9 ; third week, 50.8 ± 3.0 ; and fourth week, 54.7 ± 3.9 ; $P < 0.05$). This observation was also compared with untrained rats, which progressively diminished their $\text{VO}_{2\text{max}}$ level over the third week. Untrained rats decreased their maximal oxygen consumption levels over the weeks compared with their initial values (first week, $44.9 \pm 2.7 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; second week, 43.5 ± 2.6 ; third week, 41.6 ± 3.8 ; and fourth week, 41.1 ± 2.4 ; $P < 0.05$).

In the fourth week, trained rats presented a lower body mass gain within that time compared with untrained rats (T, $13 \pm 3.9\%$ and NT, $17\% \pm 3.8$; $P < 0.05$). Both groups showed a significant negative correlation ($r^2 = -0.65$, $P < 0.001$) between gain of body mass and the $\text{VO}_{2\text{max}}$ in each maximal test over 4 weeks.

Resting VO_2 and RER differed only in the fourth week (Table 4).

Table 4. Resting oxygen consumption and respiratory exchange ratio (RER) of untrained (NT, $n=10$) and trained rats (T, $n=10$) rats.

Time (weeks)	Group	V_{O_2} (mL kg ⁻¹ min ⁻¹)	RER (V_{CO_2}/V_{O_2})
1st week	NT	23.3 ± 1.9	0.854 ± 0.09
	T	22.9 ± 1.1	0.798 ± 0.1
2nd week	NT	25.0 ± 2.0	0.881 ± 0.06
	T	23.0 ± 1.7	0.825 ± 0.06
3rd week	NT	22.8 ± 1.3	0.862 ± 0.09
	T	23.9 ± 2.1	0.870 ± 0.1
4th week	NT	22.1 ± 1.1	0.823 ± 0.07
	T	25.4 ± 1.0*	0.779 ± 0.1*

Values are presented as mean ± S.E.M. * $P < 0.05$ when compared with untrained as indicated by two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test. Abbreviations: V_{O_2} , oxygen uptake; and V_{CO_2} , carbon dioxide output.

After confirmation of pregnancy, groups were subdivided according to their dietary intake. Trained rats (T) and trained + low-protein diet (T+LP) groups kept running at a lower intensity of effort (Table 3). Gain of body mass was lower in the last third of gestation in the groups submitted to a low-protein diet (NT, 36.9 ± 6.1 ; T, 38.2 ± 5.5 ; NT+LP, 30.1 ± 5.1 ; and T+LP, 31.5 ± 6.1 ; $P < 0.05$; Fig. 2. Data were adjusted for the number of pups born to each dam [NT, 10.5 (10–13); T, 9.5 (9–14); NT+LP, 10.0 (8–11); and T+LP, 10.0 (8–10); values expressed as median (minimum and maximum)], and the correlation coefficient between number of pups and body weight gain of the mother was not significant ($r^2 = 0.31$).

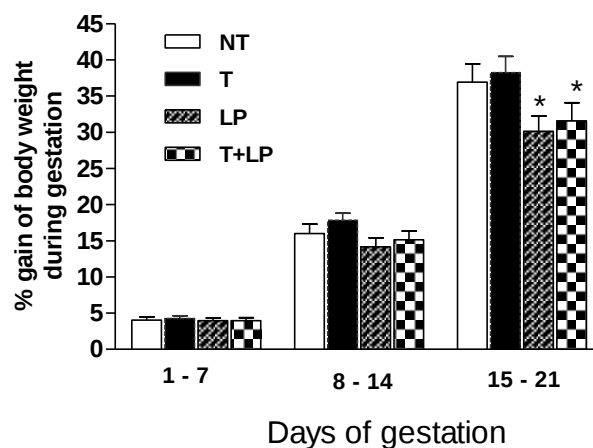


Figure 2. Body weight gain during gestation by untrained (NT, $n = 5$), trained (T, $n = 5$), untrained+lowprotein NT+LP, $n = 5$) and trainee+low-protein rats (T+LP, $n = 5$). Analysis was performed in each third of gestation, relative to the body mass on the first day of pregnancy. The values are presented as mean ± S.E.M. * $P < 0.05$ compared with NT group using two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

During gestation, rats were submitted to measurement of oxygen consumption at rest. All groups showed a progressive reduction in the values of resting VO_2 . However, in T dams, this reduction was less pronounced than in NT dams ($P < 0.05$; Fig. 3]. The NT+LP dams showed lower values of resting VO_2 than those of the NT group, while T+LP dams showed no difference from those of the NT group (Fig. 2). The values of RER did not change when groups were compared with the NT group (NT, 0.870 ± 0.03 ; T, 0.883 ± 0.08 ; NT+LP, 0.821 ± 0.06 ; and T+LP, 0.840 ± 0.09 ; $P > 0.05$).

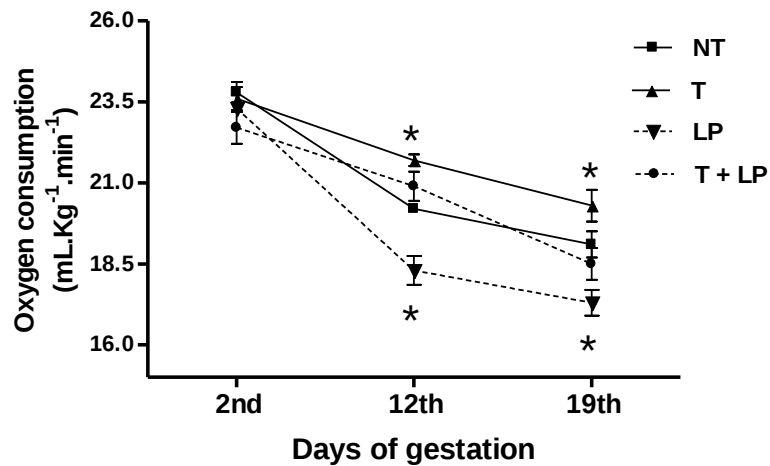


Figure 3. Resting oxygen consumption by untrained ($n = 5$), trained ($n = 5$), untrained+low protein ($n = 5$), and trained + low protein rats ($n = 5$) during gestation. The values are presented as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ when compared with untrained as indicated by two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

At weaning, the growth rate of pups from the trained group was higher than that of pups in the untrained group (Table 5). The growth rate of LP_p and T+LP_p groups was around 50% lower than that of their respective control groups. At 22–30 days of age, the NT_p and T_p groups increased their growth rate by 110% compared with the lactation period. The highest growth rate was observed between the 31st and 60th day of life ($4.0\text{--}6.0 \text{ g day}^{-1}$). In this period, T+LP_p did not show a difference when compared with NT_p . There was no difference in the growth rate among groups at the period between the 61st and 90th days. Birth weight and the body weight at weaning were not different among groups, except for NT+LP_p , which showed a lower body weight when compared with control animals (Fig. 4). Body weight of NT+LP_p was lower from the weaning on when compared with the NT_p group, while T+LP_p rats showed a difference from the 30th day onwards. From the 60th day onwards, the T_p group showed higher body weight when compared with the NT_p group.

Table 5. Growth rate of the offsprings

Growth rate (g day ⁻¹)	NT _p		T _p		NT+LP _p		T+LP _p	
1-21 days	1.3	0.09	1.8*	0.1	0.6*	0.07	0.8*	0.07
22-30 days	4.1	0.1	3.83	0.1	2.8*	0.1	3.3*	0.1
31-60 days	6.1	0.2	6.6	0.2	5.3*	0.1	5.9	0.1
61-90 days	2.6	0.1	2.9	0.1	2.6	0.1	2.5	0.1

During gestation, the dams were in untrained ($n = 17$), trained ($n = 13$), untrained+low protein ($n = 17$), and trained + low protein ($n = 13$). The values are presented as mean $\pm$ S.E.M.* $P < 0.05$ when compared with untrained as indicated by two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

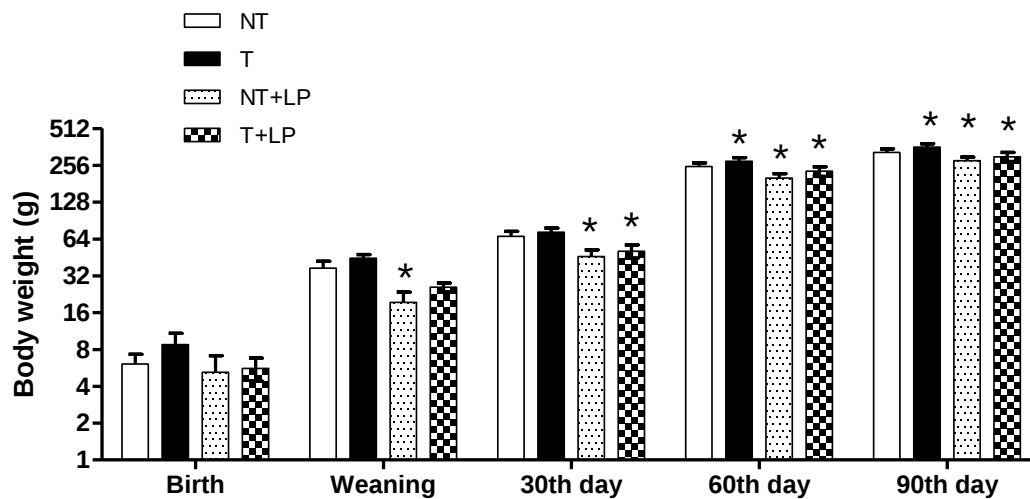


Figure 4. Body weight of offspring during growth. Rats are the offspring of untrained dams (NT_p offspring, $n = 17$), offspring of trained dams (T_p offspring, $n = 13$), untrained+low protein dams (NT+LP_p offspring, $n = 17$), and trained + low protein (T+LP_p offspring, $n = 13$). The values are presented as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ compared with NT_p group using two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

Discussion

The interactions amongst maternal exercise, fetal oxygenation and feto-placental growth are complex because the effects of exercise on the maternal physiological parameters vary with the type, frequency, duration and intensity of the exercise. In the present study, we used an animal model to investigate the values of VO_{2max} in response to a protocol of physical training during gestation in order to control some confounding variables. The resulting adaptations can therefore be more confidently attributed to the exercise programme itself, allowing us to extrapolate for humans as we consider the type, duration and intensity of the exercise.

Our data showed that trained animals increased their rate of oxygen consumption after the fourth week of training, showing a positive effect on the cardiorespiratory fitness. In females, physical training for 4 weeks (2 h day^{-1} , 5 days week^{-1} , with exercise level adjustments according to $\text{VO}_{2\text{max}}$ every week) resulted in an increase in $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Wisloff *et al.* 2001). In the present study, the intensity of the load required to induce improved performance was adjusted throughout the protocol of training, and it was also useful to reduce the intensity of training during pregnancy. Previous studies have shown that regular moderate-intensity exercise in early pregnancy enhances feto-placental growth rate and birth size of the offspring (Clapp *et al.* 2000). During gestation, half of the animals of each group were submitted to a low-protein diet. All groups showed a progressive reduction in the values of resting VO_2 during gestation. In fact, VO_2 has an inverse relationship with gain of body weight (Leandro *et al.* 2007). However, in dams previously submitted to a protocol of physical training, this reduction was less pronounced when compared with untrained dams. Physical exercise during pregnancy induces an increase in placental volume by enhancing the terminal villi, the finger-like structures formed in the placenta whose function is to fill with maternal blood and pass nutrients and oxygen on to the fetus (Thomas *et al.* 2008). In addition, since physical training can induce an increase in maternal lean body mass, the dietary low-protein-induced catabolism can be attenuated by a mechanism that includes an increase in availability of protein (Clapp, 2003). Thus, physical exercise can modulate the effect of a low-protein diet on the resting consumption of oxygen.

Beginning a moderate-intensity exercise routine early in the course of pregnancy, during the hyperplastic phase of placental growth, may be an important mechanism for improving placental functional capacity, which in turn increases nutrient and oxygen delivery and overall growth rate of the fetus later in gestation (Clapp *et al.* 2000). Our results showed that pups from trained mothers showed a higher growth at weaning than their peers and a high body weight as they grew. In a previous study, there were no differences found in body composition of pups from running trained dams (before mating, 5 days week^{-1} , for 2.0 h day^{-1} at 31 m min^{-1} up an 8 deg incline for 8 weeks; and during gestation, 27 m min^{-1} up a 5 deg incline, 1 h day^{-1} ; Treadway *et al.* 1986). The differences in the exercise protocols could justify the results. Higher intensity exercise over a long duration during gestation can induce negative outcomes for pups. In the present study, we maintained the intensity of exercise around 50–70% of $\text{VO}_{2\text{max}}$ of the mothers. The physiological mechanism can be associated with an increase of uterine blood flow that occurs during moderate-intensity exercise, as well

as with the expanded blood volume found in regularly exercising pregnant women (Saintonge & Rosso, 1981; Clapp *et al.* 2000; Clapp, 2003).

Nutrient deficiency and oxygen supply during fetal growth and development are associated with long-lasting repercussions in adult life, which are the most studied programming factors acting on the critical periods of development (Barker, 1999b). Various animal models of maternal protein restriction were developed to validate the nutritional programming concept (Ozanne *et al.* 2003; Lopes de Souza *et al.* 2008; Passos *et al.* 2008). Fetal growth in late gestation is normally limited by maternal size and the capacity to provide nutrients for the fetus, a phenomenon known as constraint (Harding, 2001). In the present study, the NT+LP_p offspring showed a reduced body weight from weaning onwards. Previous studies have demonstrated that maternal protein restriction (8% protein-restricted diet) causes changes in milk composition and volume of the lactating rats and can be related to the future body weight of their offspring (Passos *et al.*, 2008). Neonatal maternal protein restriction is associated with lower stores of maternal nutrients and, subsequently, less transfer of nutrients to the offspring, which is related to reduced postnatal growth (Passos *et al.* 2008). It has been recently suggested that malnutrition during lactation may program growth hormone mRNA expression patterns in adulthood and that these changes could be responsible for differences in growth patterns (de Moura *et al.* 2007). Moderate exercise during gestation may have beneficial effects on postnatal growth rate in the offspring from undernourished mothers. The underlying mechanisms of these effects are supposed to be related to metabolic changes, redistribution of blood flow and changes in the production of fetal and placental hormones which control growth (de Moura *et al.* 2007).

In summary, a protocol of physical training was developed for rats during gestation, based on maximal oxygen consumption. During gestation, resting oxygen consumption was measured in order to evaluate the effects of physical training in rats submitted to a low-protein diet. Physical training attenuated the negative impact of the low-protein diet on the oxygen consumption during gestation and on the growth rate of offspring.

References

- Barker DJ (1999a). Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 80, 305–307.
- Barker DJ (1999b). Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med* 31(Suppl 1), 3–6.
- Barros KM, Manhães-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos RJ, Deiró TC, Cabral-Filho JE & Canon F (2006). A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* 9, 99–104.

Bayne K (1996). Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. *Physiologist* 39, 199, 208–111.

Bayol S, Jones D, Goldspink G & Stickland NC (2004). The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr* 91, 331–339.

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL & Lillycrop KA (2007). Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 97, 1036–1046.

Clapp JF 3rd (2003). The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110(Suppl 1), S80–S85.

Clapp JF 3rd, Kim H, Burciu B & Lopez B (2000). Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol* 183, 1484–1488.

Clapp JF 3rd, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K & Lopez B (2002). Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol* 186, 142–147.

Clapp JF 3rd, Schmidt S, Paranjape A & Lopez B (2004). Maternal insulin-like growth factor-I levels (IGF-I) reflect placental mass and neonatal fat mass. *Am J Obstet Gynecol* 190, 730–736.

de Moura EG, Lisboa PC, Custodio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K & Passos MC (2007). Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem* 18, 134–139.

Dwarkanath P, Muthayya S, Vaz M, Thomas T, Mhaskar A, Mhaskar R, Thomas A, Bhat S & Kurpad A (2007). The relationship between maternal physical activity during pregnancy and birth weight. *Asia Pac J Clin Nutr* 16, 704–710.

Haakstad LA, Voldner N, Henriksen T & Bo K (2007). Physical activity level and weight gain in a cohort of pregnant Norwegian women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 86, 559–564.

Harding JE (2001). The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 30, 15–23.

Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L & Susser M (1993). Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol* 137, 1105–1114.

Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R & Pithon-Curi TC (2007). A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 21, 751–756.

Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R & Bolaños-Jiménez F (2008). Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* 27, 1400–1408.

Lucas A (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 156, 38–50; discussion 50–35.

Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães de Castro R & Bolaños-Jiménez F (2009). Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* 96, 481–492.

Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, Hartil K, Petry CJ, Buckley AJ & Mosthaf-Seedorf L (2003). Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* 177, 235–241.

Passos MC, Toste FP, Dutra SC, Trotta PA, Lisboa PC & de Moura EG (2008). Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *Br J Nutr* 101, 250–256.

Rao S, Kanade A, Margetts BM, Yajnik CS, Lubree H, Rege S, Desai B, Jackson A & Fall CH (2003). Maternal activity in relation to birth size in rural India. The Pune Maternal Nutrition Study. *Eur J Clin Nutr* 57, 531–542.

Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939–1951.

Saintonge J & Rosso P (1981). Placental blood flow and transfer of nutrient analogs in large, average, and small guinea pig littermates. *Pediatr Res* 15, 152–156.

Thomas DM, Clapp JF & Shernce S (2008). A foetal energy balance equation based on maternal exercise and diet. *J R Soc Interface* 5, 449–455.

Toscano AE, Amorim MA, de Carvalho Filho EV, Aragão Rda S, Cabral-Filho JE, de Moraes SR & Manhaes-de-Castro R (2008a). Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci* 82, 1131–1136.

Toscano AE, Manhães-de-Castro R & Canon F (2008b). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 24, 270–278.

Treadway J, Dover EV, Morse W, Newcomer L & Craig BW (1986). Influence of exercise training on maternal and fetal morphological characteristics in the rat. *J Appl Physiol* 60, 1700–1703.

Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ & Ellingsen O (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: $\text{VO}_{2\text{max}}$ and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1301–H1310.

Acknowledgements

The authors are indebted for the technical assistance of E. P. Portioli, G. de Souza and J. R. Mendonça. We also thank Dr Mary Zietlow for reviewing the English and providing technical support. This research was supported by FAPESP, CNPq and CAPES.

© 2009 The Authors. Journal compilation © 2009 The Physiological Society

Título: Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos

Title: Effects of physical training and malnutrition during pregnancy on the skull axis of the newborn rats

Autores:

Marco Fidalgo¹, Érika Michelle Correia de Macêdo¹, Renata Dantas¹, Patrícia Foerster¹, Caroline Neves¹, Raul Manhães-de-Castro¹, Carol Góis Leandro²

¹*Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil*

²*Núcleo de Nutrição, CAV, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil*

Endereço para correspondência:

Marco Fidalgo

Av. Prof Moraes Rego, 1235

Cidade Universitária

50670-901 - Recife, PE – Brasil

Telefone: (81) 21268463

Fax: (81) 21268473

E-mail: marcofidalgo1@hotmail.com

Resumo

Nos períodos críticos de desenvolvimento do organismo, estímulos ambientais como o exercício físico e a dieta podem influenciar o fluxo placentário e o crescimento somático fetal. O objetivo do presente estudo foi avaliar as repercussões do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos. Ratos machos *Wistar* foram divididos de acordo com a manipulação de suas mães: não-treinados nutridos (NT-N_f, n=25), treinados nutridos (T-N_f, n=25), não-treinados e desnutridos (NT-D_f, n=25), treinados e desnutridos (T-D_f, n=25). Mães treinadas (T-N e T-D) foram submetidas a 8 semanas de treinamento físico moderado antes e durante a gestação (60min/dia, 5 dias/sem a 65% do VO_{2max}). Mães desnutridas (NT-D e T-D) receberam dieta hipoprotéica durante a gestação (8% caseína) enquanto as nutridas (NT-N e T-N) receberam dieta normoprotéica (17% caseína). No 1º dia pós-natal foi verificado número de filhotes nascidos por ninhada, peso da ninhada e, peso ao nascer, eixo látero-lateral do crânio (ELLC) e ântero-posterior do crânio (EAPC), eixo longitudinal do corpo (EL) e comprimento da cauda (CC) de cada

neonato. No 3º dia pós-parto, os encéfalos foram extraídos e pesados. Durante a gestação, as fêmeas dos grupos T-N e NT-D apresentaram menor ganho de peso em comparação ao grupo NT-N na 3ª semana (NT-N=34,4±1,3; T-N=30,7±0,60; NT-D=25,8±0,78; T-D=29,9±0,83). Os grupos desnutridos apresentaram menor peso ao nascer em relação aos seus respectivos controles (NT-N_f=6,3±0,1; T-N_f=6,3±0,1; NT-D_f=4,7±0,07; T-D_f=5,0±0,06). O grupo NT-D_f apresentou as medidas do ELLC (NT-N_f=9,8±0,06; T-N_f=9,8±0,05; NT-D_f=9,2±0,04; T-D_f=9,6±0,13) e EAPC (NT-N_f=18,1±0,1; T-N_f=18,2±0,1; NT-D_f=17,5±0,1; T-D_f=18,0±0,2) menores comparadas aos filhotes controles. Com base nos resultados, pode-se concluir que a desnutrição no período fetal alterou o desenvolvimento somático enquanto o treinamento físico influenciou positivamente os eixos do crânio dos conceptos.

Palavras-chave: Craniometria, esforço físico, desnutrição proteica, desenvolvimento fetal

Abstract

In critical periods of development of the organism, environmental stimuli such as physical exercise and diet may influence placental flow and fetal somatic growth. The aim of this study was to evaluate the effects of physical training and malnutrition during pregnancy on the skull axis of newborn rats. Male *Wistar* rats were divided according to manipulation of their mothers: non-trained (NT-N_f, n = 25), trained (T-N, n = 25), non-trained with low-protein diet (NT-D_f, n = 25), trained with low-protein diet (T-D_f, n = 25). Mothers trained (T-N and T-D) were subjected to 8 weeks of moderate physical training before and during pregnancy (60min/day, 5 days/wk to 65% of VO_{2max}). Malnourished mothers (NT-D and T-D) received a low protein diet during pregnancy (8% casein) while their control pairs (NT-N and T-N) were fed with normal diet (17% casein). In the 1st postnatal day, it was verified the number of pups born per litter, litter weight and, birth weight, latero-lateral axis of skull (LLAS) and antero-posterior axis of skull (APAS), longitudinal axis of the body (LA) and length of tail (LT) of each neonate. On the 3rd day after delivery, the brains were extracted and weighed. During pregnancy, rats from T-N and NT-D groups showed lower weight gain compared with group NT-N at 3rd week (NT-N =34.4±1.3, T-N=30.7±0.60, NT-D=25.8±0.78, T-D=29.9±0.83). The group submitted to a low-protein diet had lower birth weight in relation to their respective controls (NT-N_f=6.3±0.1, T-N_f=6.3±0.1, NT-D_f=4.7±0.07; T-D_f=5.0±0.06). The group NT-D_f presented measures of LLAS (NT-N_f =9.8±0.06, T-N_f=9.8±0.05, NT-D_f =9.2±0.04; T-D_f=9.6±0.13) and EAPC (NT-N_f=18.1±0.1, T-N_f=18.2±0.1, NT-D_f=17.5±0.1, T-D_f=18.0±0.2) lower compared to controls. In conclusion, malnutrition during the fetal period changed the

somatic development of neonates while physical training affected positively the skull axis of the concepts.

Key-words: Craniometry, physical exertion, protein malnutrition, fetal development

Introdução

Durante a vida fetal, neonatal e infância, tecidos e órgãos apresentam períodos críticos para sua maturação e desenvolvimento⁽¹⁾. Nestes períodos, estímulos ambientais, como estresse, álcool, fumo, fármacos, hipóxia, nutrição e atividade física influenciam na estruturação dos sistemas fisiológicos⁽²⁻⁵⁾. Destes estímulos, a nutrição e o estilo de vida da mãe são determinantes para o desenvolvimento de padrões metabólicos e crescimento somático do feto⁽⁵⁾.

Vários estudos têm verificado uma relação entre a nutrição no período fetal e neonatal e o crescimento e desenvolvimento orgânico⁽⁶⁻⁸⁾. Em ratos, uma dieta deficiente (8% de proteína) resultou em alteração no desenvolvimento e tamanho do cérebro, no número de neurônios, aprendizagem e memória, na ontogênese de reflexos e no padrão de atividade locomotora^(6,9-10). O aporte inadequado de nutrientes e oxigênio pode ser o principal mecanismo que acarreta prejuízos ao crescimento feto-placentário⁽⁵⁾.

Por outro lado, o exercício físico durante a gestação, pode ter repercussões positivas no desenvolvimento fetal⁽¹¹⁾. Contudo, o benefício do exercício físico vai depender do momento da gestação e da magnitude do esforço (intensidade, duração e frequência das sessões de exercício)⁽¹²⁻¹³⁾. Em humanos, estudos apontam que exercícios físicos de intensidade moderada iniciados nos primeiros estágios da gestação podem aumentar o fluxo sanguíneo placentário com repercussões positivas sobre o crescimento intrauterino^(5,14). Por outro lado, os exercícios físicos intensos e altas rotinas diárias de atividade física durante a gestação estão associados com baixo peso ao nascer^(12,15,16). Em animais, ratas exercitadas em esteira ergométrica (20m/min, duração de 20 a 70 minutos/dia, 5dias/semana, a 10° de inclinação) apresentaram menores níveis de insulina plasmática e o peso fetal e da ninhada não foram afetados⁽¹⁷⁾. No sistema nervoso, Parnpiansil et al. (2003)⁽¹⁸⁾ verificaram que em filhotes de ratas submetidas a um protocolo de treinamento em esteira (20m/min, 30min/dia, 5 dias/semana, com aproximadamente 70% do VO_{2max}) durante a gestação, houve aumento na expressão de mRNA de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) no hipocampo cerebral e maior habilidade na aprendizagem motora espacial. Ainda, Amorim et al (2009)⁽¹⁹⁾ constataram que o treinamento físico moderado (1h/dia, 5 dias/semana, durante 7 semanas, com aproximadamente 65% VO_{2max}) não alterou o consumo de oxigênio de repouso de ratas

treinadas e desnutridas em relação aos animais controles e repercutiu positivamente na taxa de crescimento de sua prole até os 90 dias.

Uma vez que a desnutrição fetal está associada a um déficit no desenvolvimento fetal e que o treinamento físico de intensidade moderada pode atenuar estas alterações, o presente estudo tem como objetivo investigar a influência do treinamento físico e da desnutrição gestacional sobre os eixos corporais, comprimento da cauda e o peso do encéfalo de ratos neonatos.

Material e Métodos

Foram utilizadas 20 ratas albinas *Wistar* primíparas (peso corporal = 200 ± 15 g) provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclo claro/escuro (claro das 21:00 às 09:00 h, escuro das 9:00 às 21:00 h). Até o período do acasalamento, as ratas receberam dieta padrão de biotério (52% carboidrato, 21% proteína e 4% lipídios - Ração Labina[®], Agribbrands-Purina Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) - nº 23076.000312/2006-39.

As ratas foram inicialmente divididas em dois grupos: não-treinado (NT, $n=10$) e treinado (T, $n=10$). O grupo T foi submetido a um protocolo de treinamento físico moderado (60 minutos/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas, com intensidade de aproximadamente 65% do $\text{VO}_{2\text{max}}$) em esteira ergométrica adaptada para ratos (Esteira Motorizada EP-131[®], Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Após cinco semanas de treino, as ratas foram acasaladas com machos da mesma linhagem (2 ratas para cada 1 rato). Foi considerado como provável dia da concepção a visualização de espermatozóides em lâmina, em microscópio de luz, após coleta do esfregaço vaginal⁽²⁰⁾. Assim, metade dos animais de cada grupo recebeu dieta normoprotéica (caseína a 17%) e a outra metade recebeu dieta hipoprotéica (caseína a 8%), sendo formados mais dois grupos experimentais: não-treinado nutrido (NT-N, $n=5$), treinado nutrido (T-N, $n=5$) e não-treinado desnutrido (NT-D, $n=5$), treinado desnutrido (T-D, $n=5$). Os grupos T mantiveram o programa de treinamento, com duração e intensidade progressivamente reduzida (1ª sem=50min/dia, 2ª semana=30 min/dia, 3ª semana=20min/dia; 5 dias/semana, durante 8 semanas, com intensidade de aproximadamente 40% do $\text{VO}_{2\text{max}}$) até o 19º dia de gestação. Após o nascimento, ninhadas com seis filhotes machos foram divididos em quatro grupos de

acordo com a manipulação de suas mães (NT-N_f, n=25, provenientes de mães NT-N; T-N_f, n=25, provenientes de mães T-N; NT-D_f, n=25, provenientes de mães NT-D; e T-D_f, n=25, provenientes de mães T-D). Na lactação, todas as ratas receberam dieta à base de caseína a 17% até o 3º dia pós-parto.

Avaliação do peso corporal

As ratas foram pesadas semanalmente em balança eletrônica (Marte[®], modelo S-4000, com sensibilidade de 0,1g, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil), no período pré-gestacional, e diariamente, na gestação. O percentual de ganho de peso corporal das mães foi calculado tendo como base o peso do 1º dia de avaliação, segundo a fórmula:

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

No nascimento, foi verificado o número de filhotes nascidos por ninhada, peso da ninhada (g) e peso corporal (g) de cada neonato.

Avaliação murinométrica e extração dos encéfalos

No 1º dia pós-natal foram determinadas as seguintes medidas (em milímetros - mm) dos filhotes de acordo com as técnicas murinométricas sugeridas por Barros et al (2006)⁽⁶⁾ e Silva et al (2005)⁽⁸⁾: a) eixo látero-lateral do crânio (ELLC), linha perpendicular ao eixo longitudinal do crânio a qual divide ao meio os pavilhões auriculares; b) eixo ântero-posterior do crânio (EAPC), linha média da extremidade do focinho à região externa da crista occipital; c) eixo longitudinal do corpo (EL), distância entre a extremidade do focinho à extremidade posterior do corpo; d) comprimento da cauda (CC), distância entre a extremidade posterior do corpo à extremidade da cauda. As medidas foram realizadas com um paquímetro com acurácia de 0,01mm (Starret[®], Itu, SP, Brasil).

No 3º dia após o nascimento os neonatos foram sacrificados por decapitação e os encéfalos foram extraídos, lavados em solução de NaCl a 0,9% e pesados em balança eletrônica (Marte[®], modelo AL 500, com sensibilidade de 0,001g, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil).

Análise estatística

Para comparação de parâmetros das ratas durante o treinamento foi utilizado o t-test Student. Coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar ganho de peso na gestação com número de filhotes nascidos por mãe. Para comparação entre os grupos

experimentais formados foi utilizada ANOVA two-way, de medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Bonferroni para comparação múltipla. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média. O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0,05$) em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico *Graphpad Prisma*[®] (versão 4.0).

Resultados

Após as 5 semanas que precederam a concepção, o ganho de peso corporal de ambos os grupos foi semelhante (NT=10,2% e T=8,6%, $p > 0,05$). Durante a gestação, as fêmeas dos grupos T-N e NT-D apresentaram menor ganho de peso em comparação ao grupo NT-N na terceira semana [Figura 1]. Dados foram ajustados para o número de filhotes nascidos de cada mãe [NT-N, 12 (9-13); T-N, 10 (8-14); NT-D, 11 (7-12); e T-D, 12 (7-12); os valores estão expressos como mediana (mínimo e máximo)], e o coeficiente de correlação entre o número de filhotes nascidos e o ganho de peso corporal das mães não foi significativo ($r^2 = 0,16$; $p = 0,485$).

[Figura 1 – página 76]

Os filhotes provindos de mães submetidas à desnutrição na gestação apresentaram um menor peso corporal ao nascer em relação aos seus respectivos controles [Figura 2].

[Figura 2 – página 76]

Quanto ao tamanho dos eixos corporais dos filhotes, os animais do grupo NT-D_f apresentaram as medidas do ELLC e EAPC menores comparadas aos filhotes controles [Figura 3]. Não houve diferença para o EL (NT-N_f = $47,1 \pm 0,18$; T-N_f = $47,2 \pm 0,60$; NT-D_f = $46,2 \pm 0,28$; T-D_f = $46,7 \pm 0,58$), CC (NT-N_f = $15,5 \pm 0,12$; T-N_f = $15,8 \pm 0,26$; NT-D_f = $14,9 \pm 0,15$; T-D_f = $15,3 \pm 0,18$) e peso relativo dos encéfalos entre os grupos (NT-N_f = $3,87 \pm 0,10$; T-N_f = $4,31 \pm 0,31$; NT-D_f = $4,42 \pm 0,17$; T-D_f = $3,81 \pm 0,08$).

[Figura 3 – página 77]

Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de dois estímulos ambientais, treinamento físico e desnutrição, sobre os eixos cranianos de filhotes ao nascer. A desnutrição, quando aplicada no início da vida, pode estar associada à déficits no crescimento e desenvolvimento⁽⁶⁻⁷⁾. Por outro lado, o treinamento físico leve e moderado durante a gestação tem sido considerado um estímulo positivo para o crescimento feto-placentar^(5,12).

O ganho de peso materno durante a gestação tem por finalidade acumular reservas energéticas para o desenvolvimento embrionário⁽⁵⁾. Em relação à desnutrição durante a gestação, nossos resultados corroboram dados encontrados na literatura, os quais verificaram que o uso de dietas hipoproteicas (8% de caseína) e restrição de dieta controle (50% da quantidade) induziram déficits no peso corporal das mães⁽⁶⁻⁷⁾.

Exercícios físicos regulares durante a gestação podem ser estratégias efetivas para o controle no ganho de peso^(13,22). No presente estudo, o treinamento físico durante a gestação induziu redução no ganho de peso corporal materno. Em contraste, Treadway et al (1986)⁽²³⁾ observaram que ratas submetidas somente ao treino (31 m/min, 2 h/dia, 5 dias/semana, 8 semanas; durante a gestação: 27 m/min, 1 h/dia) apresentaram maior ganho de peso durante a gestação. Nossos achados fornecem indícios de que o treinamento no período gestacional possa ter induzido ganho de massa muscular e redução de tecido adiposo^(11,13).

A disponibilidade de nutrientes é essencial para manutenção da função placentária e formação fetal. Ozanne et al. (1999)⁽²⁴⁾ associam a desnutrição precoce a uma redução dos depósitos maternos, comprometimento no fluxo feto-placentário e na taxa de divisão celular nos tecidos e órgãos dos fetos. Estudos adotando modelo de restrição na quantidade da dieta verificaram redução no peso corporal ao nascer, no tamanho do neonato e no peso de órgãos^(1,7,21). Por sua vez, o exercício físico induz flutuações intermitentes na oferta de substratos. Desta forma, é produzido um estímulo recorrente que, mesmo diante da privação, ocorre difusão de nutrientes e oxigênio para o feto⁽⁵⁾. Amorim et al (2009)⁽¹⁹⁾ verificaram que o treinamento físico moderado atenuou os impactos de uma dieta hipoproteica sobre o consumo de oxigênio de repouso de ratas durante a gestação e aumentou a taxa de crescimento de sua prole até os 90 dias. Exercícios físicos moderados realizados durante a gestação podem estimular mecanismos que incluem aumento do aporte de nutrientes e oxigênio para o feto, através do incremento no fluxo placentário, repercutindo no peso ao nascer⁽⁵⁾.

Estudos prévios demonstram que a desnutrição fetal e neonatal pode alterar o tamanho dos eixos cranianos e crescimento cerebral^(6,8). A avaliação das medidas cranianas é muito

utilizada em estudos com humanos e experimentais e apresenta relação direta com insultos nutricionais precoces e o desenvolvimento do sistema nervoso⁽²⁵⁾. Além do peso como indicador de complicações intrauterinas, a verificação de medidas craniofaciais é fundamental para identificação da existência de anormalidades, como redução da massa cerebral, do comprometimento no desenvolvimento neuromotor e dos processos que influenciam a gênese de patologias na idade adulta⁽²⁵⁾. Nossos resultados apontam que a desnutrição fetal foi determinante para diminuição no tamanho dos eixos cranianos. Silva et al (2006)⁽⁸⁾ utilizando modelo de desnutrição através de dieta com 8% de proteína (DBR – Dieta Básica Regional) observaram também redução nas medidas dos animais desnutridos. Sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, Bennis-Taleb et al., (1999)⁽²⁶⁾ submetendo ratas a dieta hipoproteica (8% de proteína) durante a gestação, observaram, na prole, redução da concentração de DNA no prosencéfalo, alteração na densidade de vasos sanguíneos do córtex cerebral no terceiro dia pós-parto e redução na vascularização na idade adulta.

Escassos são os estudos que verificam a influência do exercício sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e medidas cranianas. Entretanto, parece que o exercício físico é efetivo para proteger o cérebro. Parnpiansil et al (2003)⁽¹⁸⁾ verificando a influência do exercício físico sobre o desenvolvimento do encéfalo observaram em filhotes de ratas exercitadas em esteira aumento na expressão de mRNA de BDNF. No presente estudo, o protocolo de treino utilizado parece ter sido eficiente, pois os filhotes do grupo treinado e treinado desnutrido não apresentaram diferenças no tamanho dos eixos cranianos em relação aos animais controle. O treinamento físico durante a gestação aumentando o fluxo placentário e a oferta de nutrientes e oxigênio para o feto⁽⁵⁾, a hipótese de que tenha ocorrido preservação das estruturas craniofaciais por um mecanismo de neuroproteção parece plausível⁽²⁷⁾.

Conforme nossos achados, é possível que o treinamento de intensidade leve a moderada atenuar as consequências da desnutrição no período crítico do desenvolvimento. Pelo que já foi aventado, parece que a maior irrigação feto-placentária e disponibilidade de nutrientes e oxigênio neste período, proporcionada pelo aumento da demanda em consequência do esforço, é favorável para programar o crescimento intra-uterino. A relevância do tema aponta a necessidade de continuidade nas investigações, verificando a influência do treinamento físico materno associado à dieta sobre a neuroplasticidade e o desenvolvimento neuro-motor destes animais em diferentes idades.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por tornarem possível a realização deste estudo.

Referências Bibliográficas

1. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross, MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1224-32.
2. Kumsta R, Entringer S, Hellhammer DH, Wüst S. Cortisol and ACTH responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32:1153-7.
3. Lopes de Souza S, Nogueira MI, Deiro TCBJ, Manhães-de-Castro FM, Mendes-da-Silva C, Silva MC, et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. *Physiol Behav.* 2004;82:375–79.
4. Strauss RS. Effects of the intrauterine environment on childhood growth. *Br Med Bull.* 1997;33:81-95.
5. Clapp JF. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. *Placenta.* 2006;27:527-34.
6. Barros KMFT, Manhães-de-Castro R, Lopes-de-Souza S, Matos RJB, Deiró TCBJ, Cabral-Filho JE, et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci.* 2006;9:99-104.
7. Desai M, Crowtherl NJ, Lucas A, Hales N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr.* 1996;76:591-603.
8. Silva HJ, Marinho SMOC, Toscano AE, Albuquerque CG, Moraes SRA, Manhães-de-Castro R. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. *Int J Morphol.* 2005;23:227-30.
9. Gressens P, Muaku SM, Besse L, Nsegbe E, Gallego J, Delpech B, et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;103:21-35.
10. Do Monte-Silva KK, Assis FL, Leal GM, Guedes RC. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. *Nutr Neurosci.* 2007;10:187-94.

11. Clapp III JF. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;110:S80–S5.
12. Clapp III JF, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K, Lopez B. Continuing regular exercise during pregnancy: Effect of exercise volume on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:142-47.
13. Leitão MB, Lazzoli JK, Oliveira MAB, Nóbrega ACL, Silveira GG, Carvalho T, et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade Física e Saúde na Mulher. *Rev Bras Med Esporte.* 2000;6:215-20.
14. Clapp III JF, Kim H, Burciu B, Lopez B. Beginning regular exercise in early pregnancy: Effect on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:1484-8.
15. ACOG Committee Opinion. Exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol.* 2002;99:171-3.
16. Rao S, Kanade A, Margetts BM, Yajnik CS, Lubree H, Rege S, et al. Maternal activity in relation to birth size in rural India. The Pune Maternal Nutrition Study. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:531–42.
17. López-Luna P, Iglesias MA, Muñoz C, Herrera E. Aerobic exercise during pregnancy reverts maternal insulin resistance in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30:1510-14.
18. Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanezb T, Kotchabhakdi N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett.* 2003;352:45-8.
19. Amorim MF, Santos JA, Hirabara SM, Nascimento E, Lopes-de-Souza S, Manhães-de-Castro R, et al. Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? *Exp Physiol.* 2009;94:906–13.
20. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609-14.
21. Araya J, Reyes MC, Baginsky CM, Ruz M. Cellular growth of uterus, placenta and fetus during chronic maternal caloric restriction in rats. *Arch Latinoam Nutr.* 1983;33:814-25.
22. Artal R, O'Toole M, White S. Guidelines of the American College of Obstetricians and Gynecologists for exercise during pregnancy and the postpartum period. *Br. J. Sports Med.* 2003;37:6-12 .

23. Treadway J, Dover EV, Morse W, Newcomer L, Craig BW. Influence of exercise training on maternal and fetal morphological characteristics in the rat. *J Appl Physiol.* 1986;60:1700–03.
24. Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc.* 1999;58:615-9.
25. Graves AB, Mortimer JA, Larson EB, Wenzlow A, Bowen JD, McCormick WC. Head circumference as a measure of cognitive reserve – Association with severity of impairment in Alzheimer’s Disease. *Br J Psychiatry.* 1996;169:86-92.
26. Bennis-Taleb N, Remacle C. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr.* 1999;129:1613-9.
27. Dishman RK. The new emergence of exercise neurobiology. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16:379-80.

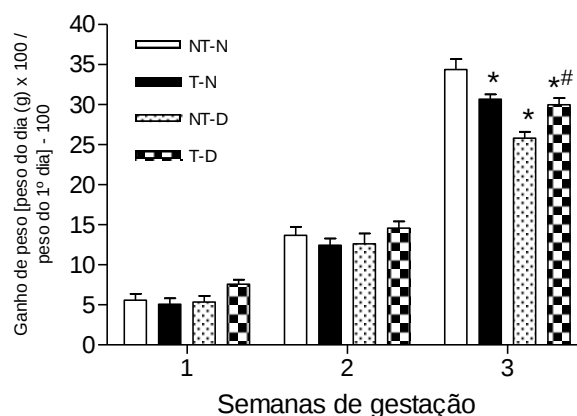


Figura 1 – Ganho de peso corporal das mães durante as três semanas de gestação. Grupos: NT-N (n=5); T-N (n=5); NT-D (n=5) e T-D (n=5). Os dados estão representados em média±EPM. *p<0,05 vs NT-N, #p<0,05 vs NT-D. ANOVA two-way, de medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni.

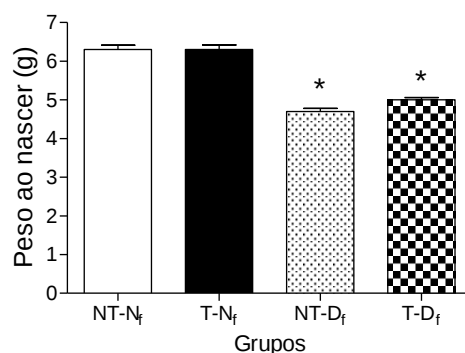


Figura 2 – Peso ao nascer dos filhotes. Grupos: NT-N_f (n=25); T-N_f (n=25); NT-D_f (n=25) e T-D_f (n=25). Os dados estão representados em média±EPM. *p<0,05 vs NT-N. ANOVA two-way, de medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni.

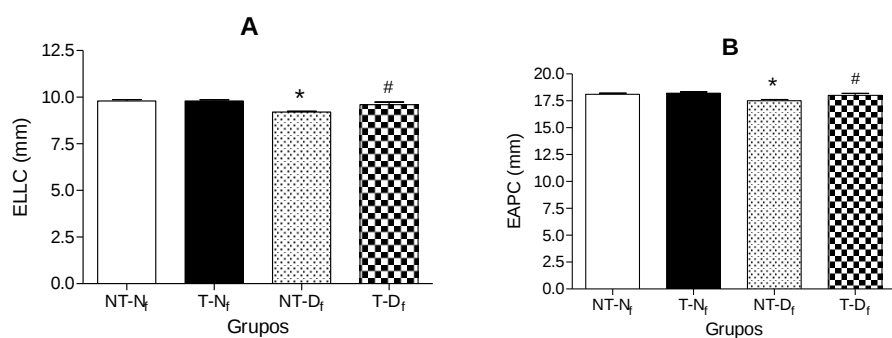


Figura 3 – ELLC e EAPC dos filhotes. Grupos: NT-N_f (n=25); T-N_f (n=25); NT-D_f (n=25) e T-D_f (n=25). Os dados estão representados em média±EPM. *p<0,05 vs NT-N, #p<0,05 vs NT-D. ANOVA two-way, de medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni.

Title: Maternal moderate physical training re-programs the effect of a perinatal low-protein diet in adult offspring

Running-title: Physical training attenuated perinatal nutritional programming

Key-words: Glucose homeostasis, gestational exercise, perinatal undernutrition.

Marco Fidalgo¹

Filipe Tebas de Oliveira¹

Adriano Bento¹

Érika Michele Correia de Macêdo¹

Raul Manhães de Castro¹

Egberto Gaspar de Moura²

Patrícia Lisboa²

Carol Góis Leandro³

I, Marco Fidalgo, declare that all authors listed are eligible for authorship.

Affiliations of all authors:

¹ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, CAV, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Mailing address:

Marco Fidalgo

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

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

E-mail: marcofidalgo1@hotmail.com

Abstract

The effects of a maternal moderate-low physical training on post-natal development, glucose homeostasis, and leptin concentration were investigated in adult offspring whose mothers were submitted to a low protein diet during the perinatal period. Male Wistar rats were divided into four groups according to their mother's manipulation: untrained (NT_p, *n* = 8); trained (T_p, *n* = 8); untrained with low-protein diet (NT+LP_p, *n* = 8); and trained with low-protein diet (T+LP_p, *n* = 8). Trained mothers were submitted before pregnancy to a protocol of moderate physical training over a period of 4 weeks (5 days /week, and 60 min/day) on a treadmill. At pregnancy, the intensity and duration of the exercise was reduced. Low-protein groups received an 8% casein diet, and their peers received a 17% casein diet. The pup's birth weight and somatic growth were weekly recorded up to the 150th day of life. Glucose and insulin tolerance test (GTT and ITT), fasting blood glucose, cholesterol and serum leptin were determined at 150th day of life. Pups from trained mothers showed no changes in the somatic and biochemical parameters all over the experiments. Low protein offspring showed a reduction in the body weight, body length, in all of the ages. At 150d, those animals showed a higher abdominal circumference, hyperglycaemia, hypercholesterolemia, glucose resistance, and lower serum leptin. In T+LP animals, all of those alterations were reversed except for the leptin concentration. In conclusion, our data confirm the negative consequences of perinatal undernutrition in the somatic and metabolic parameters in adult rats and moderate physical training re-programmes the effects of perinatal undernutrition.

Introduction

Peri- and preconceptional periods is now thought to be critical for the long-term effects on fetal development and postnatal growth and may predispose offspring to phenotypic changes and metabolic diseases later in life (Hanson & Gluckman, 2005). Unbalanced nutrient intake during critical period of development has been associated to subsequent risk of health and disease in the offspring according to epidemiological data and numerous experimental observations (Barker, 2007). This phenomenon have been termed “predictive adaptive responses” (Gluckman & Hanson, 2004).

Animal studies have demonstrated that the timing, duration, and exact nature of the insult during critical developmental windows are determinants of the pattern of growth and metabolism of the adult offspring (Fowden *et al.*, 2006). Our previous studies demonstrated that a malnutrition (multi-deficient diet) during lactation induces a delay in the maturation of reflexes, and deficits in locomotion patterns caused by postnatal malnutrition in rats (Barros *et al.*, 2006). A low-protein diet (8% casein) during gestation was associated with changes in skeletal muscle mechanical properties in offspring of rats (Toscano *et al.*, 2008). In addition, the reductions in protein or caloric intake during perinatal period may influence feeding behavior in adult rats (Lopes de Souza *et al.*, 2008). In fact, maternal protein restriction induces an increased rate of postnatal weight gain (‘catch-up growth’) that is associated with reduced satiety by a mechanism that includes reduced serum leptin concentration in adult life (Zambrano *et al.*, 2006). Such structural and functional changes in the offspring can be related to reduced nutrients in placental space, and reduced oxygen consumption by dams (Barker, 1999).

A regular moderate-to-low intensity physical activity during gestation has been associated with increase resting maternal plasma volume, a higher fetal oxygenation and fetoplacental growth, and increased birth weight (Clapp *et al.*, 2002). Recently, we demonstrated that a controlled moderate to low- intensity physical training before and during gestation attenuated the impact of the low-protein diet by improving mothers resting oxygen consumption (Amorim *et al.*, 2009). Low to moderate physical exercise (40 – 70% of $\text{VO}_{2\text{max}}$) is associated with improved cardiorespiratory fitness, increased metabolic rate (reduction of body weight), and elevated lean body mass (Leandro *et al.*, 2007). At rest, the rate of placental bed blood flow increases, and more glucose and oxygen delivery to the placental site are observed in women submitted to a physical training (Clapp, 2003). An epidemiological study found that a moderate physical exercise during pregnancy is associated with a 100 – 150 g increase in the birth weight (Hatch *et al.*, 1993).

In the present study, it was investigated in the rat the effects of a maternal moderate-low physical training on post-natal development, glucose homeostasis, and leptin concentration in adult offspring whose mothers were submitted to a low protein diet during perinatal period. Our hypothesis is that exercise-induced physiological adaptations during gestation could attenuate or modulate the impact of a perinatal low-protein diet on adult offspring.

Material and Methods

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Bayne, 1996).

Animals

Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 60 days were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. Female rats were maintained at a room temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a controlled light–dark cycle (dark 09.00–21.00 h). Standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids, Agribbrands-Purina Ltd., Paulínia, SP, Brazil) and water were given *ad libitum*. Animals were randomly divided into two groups: untrained rats (NT, $n = 8$) and trained rats (T, $n = 8$). Trained rats were submitted to a training programme of moderate running over a period of 4 weeks (5 days week^{-1} and 60min day^{-1}) on a treadmill (Insight Equipments Ltd., Ribeirão Preto, SP, Brazil) at a controlled intensity based on their $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Amorim *et al.*, 2009). After the 4 weeks of training period, the rats were mated (2 females for 1 male). The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception, day 0 of pregnancy. Pregnant rats were then transferred to individual cages. Half of the rats from each group received a 17% casein diet and the other half received an 8% casein isocaloric diet (low-protein group, LP) (Reeves *et al.*, 1993) *ad libitum*. Thus, two more groups were formed, as follows: untrained (NT, $n = 4$); trained (T, $n = 4$); untrained with low-protein diet (NT+LP, $n = 4$); and trained with low-protein diet (T+LP, $n = 4$). The exercise programme was maintained during gestation, with a progressive reduction of duration and intensity until the 19th day of gestation. There was no physical exercise during the suckling period. During the lactation, the offspring were kept in litters of six pups and their mothers remained fed with the respective diet either 8% casein or 17% casein diet. Only male offspring from each litter were used. In the all subsequent experiments, 1–2 male offspring were randomly chosen from

each litter. The pups were divided into four groups according to their mother's manipulation: untrained (NT_p, $n = 8$); trained (T_p, $n = 8$); untrained with low-protein diet (NT+LP_p, $n = 8$); and trained with low-protein diet (T+LP_p, $n = 8$). At 150 d old, pups were killed by cardiac exsanguination.

Protocol of physical training

The protocol of physical training was performed according to Amorim *et al.* (2009). Briefly, rats ran in a treadmill during 4 weeks (5 days.wk⁻¹, 60 min.day⁻¹) before pregnancy. The protocol was divided into four progressive stages in each session: (i) warm-up (5 minutes); (ii) intermediary (10 minutes); (iii) training (30 minutes), and (iv) cool-down (5 minutes) periods. The percentage of VO_{2max} during the sessions of training before gestation was kept around 55 – 65%. During pregnancy, rats ran (5 days.wk⁻¹), at a progressively lower duration and intensity of effort [first week = 50 min.day⁻¹ (around 65% of VO_{2max}), second week = 30 min.day⁻¹ (around 45% of VO_{2max}), third week = 20 min.day⁻¹ (around 32% of VO_{2max})]. There is no physical training during the lactation period.

Measurement of food intake and body weight during gestation

During gestation, dams were housed individually and its daily food consumption determined by the difference between the amounts of food provided at the onset of the light cycle and the amount of food remaining 24 h later. Body and food weights were recorded to 0.01 g (Lopes de Souza *et al.*, 2008). The body weight was daily recorded throughout the experiment with a Marte Scale, AS-1000, approaching 0.01 g. Percentage weight gain (% BWG) was calculated by the formula: % BWG=[body weight (g)× 100/weight at first day of gestation (g)]– 100.

Blood glucose measurements

Fasting glycaemia levels were evaluated weekly during gestation by using blood samples from the tail vein of the rats, using a glucosimeter (Accu Check Advantage and Accutrend GCT) by glucose oxidase method.

Post-natal developmental patterns of offspring

The body weight of pups was weekly recorded throughout the experiment with a Marte Scale, AS-1000, approaching 0.01 g. Percentage weight gain (% BWG) was calculated at different intervals of time until 150d old (birth to 30th, 31st to 90th, and 91st to 150th) by the

formula: % BWG=[body weight (g)× 100/weight at first day in the interval (g)]– 100. The body lengths of pups were recorded by measuring the external surfaces (nose-to-anus length) using a digital caliper (0.01 mm accuracy). Abdominal circumference (AC) was recorded by measuring the midway between the lower rib margin and the iliac crest in the horizontal plane (Novelli *et al.*, 2007).

Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) of offspring

The GTT was performed at 145 d and the ITT at 147 d old. In both tests, animals were fasted overnight. The blood sample collection was performed by cutting the tip of the tail, to remove around 10 µL of blood. The first blood sample was collected (time zero) before the injection of glucose. In the GTT, it was administered intraperitoneally, a glucose solution 50% (Equiplax Pharmaceutical Ltd., GO, Brazil) at dose of 1mg/1g of the body weight. Blood sample was then collected at 15, 30, 45, 60 and 120 minutes after administration. The area under the glucose curve was obtained by blood glucose values at 0, 30, 60 and 120 minutes using the trapezoidal method (Le Floch *et al.*, 1990). In the ITT, it was administered intraperitoneally, a solution of insulin (Eli Lilly do Brazil Ltd., SP, Brazil) at dose of 0.75mU/1g body weight, and other blood samples were collected at 15, 30, 45, 60 and 120 minutes. With the blood glucose values obtained at 0, 30 and 60 minutes was calculated the rate of disappearance of glucose (Le Floch *et al.*, 1990).

Resting blood glucose, cholesterol and leptin

At 150 d old, animals were anesthetized with ketamine (0.25 mL/100g body weight) and xylazine (0.25 mL/100g body weight). The blood was sampled by cardiac puncture for fasting (6h) serum glucose, cholesterol, and leptin levels quantification. Glycaemia and cholesterolemia were determined in blood samples by using a glucosimeter and a cholesterol meter (Accu Check Advantage and Accutrend GCT, Roche Diagnostics Ltd., Mannheim, Germany), respectively. Plasma leptin concentration was determined by radio-immunoassay (RIA) kit (Linco Research Inc., St Charles, MO, USA), with an assay sensitivity of 0.5ng.mL⁻¹ and intra-assay variation coefficient of 2.9%. Samples were analyzed in a one assay.

Statistical analysis

Results are presented as means ± standard error of the mean. For statistical analysis, Pearson's correlation coefficient was used to correlate weight gain with number of pups born per mother. Among groups, data were analyzed by two-way repeated measures ANOVA, with

mother diet (LP) and physical training (T) as factors. Bonferroni's *post hoc* test was used. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effects of physical training and low-protein diet on body weight gain, food intake and fasting blood glucose of dams during gestation

At the second and third week of gestation, trained mothers were shown to have a higher gain of body weight when compared to control (Fig.1A). The effects of a low-protein diet on gain of body during gestation were seen at third week of gestation only in untrained dams (NT+LP) (Fig.1A). Data were adjusted for the number of pups born to each dam [NT, 11.0 (9–13); T, 11.5 (9–14); NT+LP, 10.5 (8–11); and T+LP, 11.0 (9–12); values expressed as median (minimum and maximum)]. Pearson's correlation coefficient between number of pups and gain of body weight of the mother was not significant ($r^2 = 0.47$, $p=0.452$). Fasting blood glucose did not change in all of the groups except for NT+LP mother that showed higher values when compared to control (Fig 1B). Relative daily food intake during gestation was not different among groups except for T+LP in the 1st week (Fig 1C).

[Figure 1 – page 91]

Effects of physical training and low-protein diet during gestation on post-natal developmental patterns of offspring

Pups from mothers submitted to a programme of physical exercise before and during gestation and/or to a low protein diet during gestation were evaluated from the birth to 150 d. Pups from trained mothers showed no changes in the somatic parameters all over the experiments, as compared with NT group. On the other hand, pups from mothers submitted to a low-protein diet showed a reduction in the body weight and body length in all of the ages (Table 1). NT+LP_p animals showed a noticeable increase in the body weight gain in the interval of 31st to 90th day of life when compared to their control. However, animals from T+LP group showed a reduction in the somatic parameters only to the age of 30d when compared to NT_p group. At the 60d on, these animals showed differences when compared to NT+LP_p group. Body weight gain was higher than NT_p, but lower than NT+LP_p at the interval of 31st to 90th day of life. At 150th day of life, NT+LP_p animals showed a higher abdominal circumference than NT_p and T+LP_p animals (Table 1).

[Table 1 – page 92]

Effects of physical training and low-protein diet during gestation on blood biochemical parameters of offspring

Pups were submitted to glucose and insulin tolerance test (GTT and ITT, respectively). The areas under glycemic curve were evaluated and groups were compared. Pups from trained mothers did not change the response to GTT and ITT when compared to the NT group (Fig. 2). On the other hand, pups from NT+LP mothers showed an increase in the area under the glucose curve when compared to their controls (Fig 2A). The rate of disappearance of glucose was lower in NT+LP_p animals (Fig. 2B). There was no difference in T+LP_p animals.

[Figure 2 – page 93]

At 150th day of life, NT+LP_p animals showed a higher fasting glycaemia, and cholesterolemia when compared to their control. However, in T+LP_p animals, the glycaemia (NT=91.1± 1.6; T=98.0± 2.1; NT+LP=108.4± 2.0; T+LP=91.3± 3.8), and cholesterolemia (NT=153.3.1 ± 0.6; T=156.0 ± 1.4; NT+LP=172.1 ± 1.3; T+LP=164.1 ± 0.9) was less pronounced (Fig. 3).

[Figure 3 – page 93]

Plasma leptin concentration was lower in the NT+LP_p and T+LP_p animals when compared to NT animals (NT=4.4 ± 1.3; T=4.3± 0.7; NT+LP=1.8± 0.1; T+LP=1.3± 0.1) (Fig. 4).

[Figure 4 – page 94]

Discussion

Maternal protein restriction is associated with lower stores of maternal nutrients and, subsequently, less transfer of nutrients to the offspring, which is related to reduced postnatal growth (Ozanne & Hales, 2002). Maternal lifestyle, namely moderate exercise during gestation may have beneficial effects on the somatic growth in the offspring from undernourished mothers by a mechanism that include increasing of uterine blood flow, redistribution of blood flow, changes in the production of fetal and placental hormones which

control growth, and higher resting oxygen consumption (Clapp *et al.*, 2002; Clapp *et al.*, 2004; Amorim *et al.*, 2009). In the present study, it was tested the hypothesis that maternal moderate-low physical training attenuates the impairment of perinatal malnutrition on the post-natal development, glucose homeostasis, and serum leptin concentration of offspring in later life.

Maternal weight gain pattern is used to assess pregnancy outcome, particularly the weight gain during the last third that is related to fetal birth weight (Amorim *et al.*, 2009). In the present study, although trained mothers were shown to have a higher gain of body weight in the second and third week of gestation, the birth weight of their pups did not alter when compared to control. In addition, there were no effects on the post-natal development and biochemical parameters of the pups from trained mothers when compared to their untrained controls. In human and animal studies, it has been shown that the environment during development can affect the phenotype in either adverse or beneficial ways in the absence of changes in fetal growth (Gluckman & Hanson, 2004). The positive or negative long-lasting effects on the offspring during development can be directly associated when the perinatal environmental challenge is particularly strong and adaptive responses are inadequate (Hanson & Gluckman, 2005). Thus, moderate physical training can be considered as a positive stimuli during pregnancy and previous studies have shown that a regular moderate-intensity exercise in early pregnancy enhances feto-placental growth rate and birth size of the offspring (Clapp *et al.*, 2000).

In the present study, the effects of a perinatal low-protein diet on the maternal gain of body weight, and fasting glycaemia converge with previous studies (Lucas *et al.*, 1996; Ozanne & Hales, 1999; Zambrano *et al.*, 2005). Low protein offspring can remain growth retarded throughout life, even when fed the control diet *ad libitum* from weaning (Desai *et al.*, 1995). In fact, our data show that pups from undernourished mothers have shown a lower trajectory of postnatal growth. However, abdominal circumference, as a marker of obesity in rats (Novelli *et al.*, 2007), was higher in pups at 150d from undernourished dams. These observations suggest that at 150d of age, there was fat accumulation in the abdominal region in those animals.

A higher maternal fasting glycaemia can lead to excess fetal insulin, and animal studies suggest that fetal hyperinsulinemia can alter expression of hypothalamic neurotransmitters, leading to offspring hyperphagia and increased body weight gain (Cripps *et al.*, 2005). In the present study, low protein offspring showed a noticeable catch up of growth in the period of 31 to 90 d of life. However, previous study have published that the restoration

of normal body weight is accompanied by a decreased percentage body protein and increased fat in offspring (Zambrano *et al.*, 2006). In addition, low protein pups showed an increase in fasting glycaemia and colesterolemia. Those effects have been seen in previous studies and are a classical beginning of insulin resistance and dislipidemia associated with developmental origin of metabolic syndrome (McMillen & Robinson, 2005).

In the present study, it was seen in low protein animals, a higher area under the glucose curve and a lower rate of disappearance of glucose than their pairs. Our observations confirm the data provided in previous studies (Zambrano *et al.*, 2006). It has been observed that perinatal restricted nutrients intake can reduce the content of insulin in β -cells or impair the insulin secretion in response to glucose and amino acids in the adult offspring (Langley-Evans, 2007). In addition, adult offspring from undernourished mothers have a impaired peripheral glucose tolerance (Ozanne & Hales, 2002). The mechanisms have been related to a post-receptor defect in the insulin signaling profiles in skeletal muscle as seen in low birth weight men and low protein model in rats (Ozanne *et al.*, 2005).

Low protein offspring showed a lower plasma leptin concentration. In adult rats (110d) submitted to a low protein diet (10% casein), Zambrano *et al.* (2006) verified a lower serum leptin concentration. The hormone leptin plays an important role in central nervous control of appetite and there is a correlation between serum leptin and relative food intake per gram body weight (Zambrano *et al.*, 2006). Our data showed that perinatal low-protein diet can programme the serum leptin concentration in adult offspring.

Our main concern in this study was to test the hypothesis that moderate physical training before and during gestation attenuates the effects of a perinatal low protein undernutrition. Physical exercise during gestation induces: *i*) increase in placental volume by enhancing the terminal villi; *ii*) increase in placental blood during rest; *iii*) increase in pass of nutrients and oxygen onto the fetus (Clapp, 2003); *iv*) increase in maternal lean body mass (Thomas *et al.*, 2008); and *v*) increase resting oxygen consumption (Amorim *et al.*, 2009). Indeed, the effects of low-protein diet on the post-natal development and glucose homeostasis in the offspring were attenuated in pups from trained mothers. In those mothers, the body weight gain and fasting glucose during gestation was maintained probably by the increase of lean body mass, and higher glucose uptake by exercised muscle. Exercise-induced decreased circulating glucose concentrations during pregnancy is related to the magnitude of effort (intensity and duration), the time in pregnancy when the measurements are taken, and the mothers physical fitness (Clapp *et al.*, 2002). In the present study, we used a protocol of physical training for pregnant where the intensity during the sessions of exercise was

controlled based on direct measurements of oxygen consumption. Thus, the present study confirm that moderate exercise during gestation have beneficial effects for both maternal physiology and postnatal growth rate in the offspring from undernourished mothers.

Pups from those mothers showed improved measurements (body weight, body length and abdominal circumference), a lower percentage of body weight gain (less pronounced 'catch up') and no effects on fasting glycaemia and cholesterolemia, and glucose homeostasis. Interestingly, in those animals there was no protective effect on the serum leptin concentration. The studies about physical exercise during gestation and the long-lasting effects on the development of offspring are scarce. But, it seems that the redistribution of blood flow and changes in the production of fetal and placental hormones which control growth can be associated to these alterations.

In summary, moderate physical training before and during gestation did not induce long-lasting effects on the somatic development, glucose homeostasis, and serum leptin concentration in pups. On the other hand, our data confirm the negative consequences of perinatal undernutrition in adult rats. The results have shown some indicatives of metabolic syndrome since a remarkable picture of hyperglycaemia, hypercholesterolemia, glucose resistance, and lower leptinemia has been found. Moderate physical training re-programmed the effects of perinatal undernutrition in adult rats.

Acknowledgments

The authors are indebted for the technical assistance of Lucia Pires and Edeones França. This research was supported by FACEPE, CNPq and CAPES.

References

- Amorim MF, dos Santos JA, Hirabara SM, Nascimento E, de Souza SL, de Castro RM, Curi R & Leandro CG. (2009). Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? *Exp Physiol* **94**, 906-913.
- Barker DJ. (1999). Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* **80**, 305-307.
- Barker DJ. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* **261**, 412-417.
- Barros KM, Manhaes-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos RJ, Deiro TC, Cabral-Filho JE & Canon F. (2006). A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* **9**, 99-104.

- Bayne K. (1996). Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist* **39**, 199, 208-111.
- Clapp JF, 3rd. (2003). The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and fetoplacental growth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **110 Suppl 1**, S80-85.
- Clapp JF, 3rd, Kim H, Burciu B & Lopez B. (2000). Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. *American journal of obstetrics and gynecology* **183**, 1484-1488.
- Clapp JF, 3rd, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K & Lopez B. (2002). Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. *American journal of obstetrics and gynecology* **186**, 142-147.
- Clapp JF, 3rd, Schmidt S, Paranjape A & Lopez B. (2004). Maternal insulin-like growth factor-I levels (IGF-I) reflect placental mass and neonatal fat mass. *American journal of obstetrics and gynecology* **190**, 730-736.
- Cripps RL, Martin-Gronert MS & Ozanne SE. (2005). Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci (Lond)* **109**, 1-11.
- Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A & Hales CN. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochemical Society transactions* **23**, 331-335.
- Fowden AL, Giussani DA & Forhead AJ. (2006). Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* **21**, 29-37.
- Gluckman PD & Hanson MA. (2004). Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science (New York, NY)* **305**, 1733-1736.
- Hanson MA & Gluckman PD. (2005). Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects. *J Physiol* **565**, 27-34.
- Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L & Susser M. (1993). Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol* **137**, 1105-1114.
- Langley-Evans SC. (2007). Metabolic programming in pregnancy: studies in animal models. *Genes Nutr* **2**, 33-38.
- Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D & Perlemuter L. (1990). Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care* **13**, 172-175.
- Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R & Pithon-Curi TC. (2007). A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* **21**, 751-756.

- Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R & Bolanos-Jimenez F. (2008). Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* **27**, 1400-1408.
- Lucas A, Baker BA, Desai M & Hales CN. (1996). Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br J Nutr* **76**, 605-612.
- McMillen IC & Robinson JS. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* **85**, 571-633.
- Ozanne SE & Hales CN. (1999). The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* **58**, 615-619.
- Ozanne SE & Hales CN. (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 368-373.
- Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S & Vaag AA. (2005). Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* **48**, 547-552.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- Thomas DM, Clapp JF & Shernce S. (2008). A foetal energy balance equation based on maternal exercise and diet. *J R Soc Interface* **5**, 449-455.
- Toscano AE, Manhaes-de-Castro R & Canon F. (2008). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* **24**, 270-278.
- Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F & Nathanielsz PW. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* **571**, 221-230.
- Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F & Nathanielsz PW. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* **563**, 275-284.

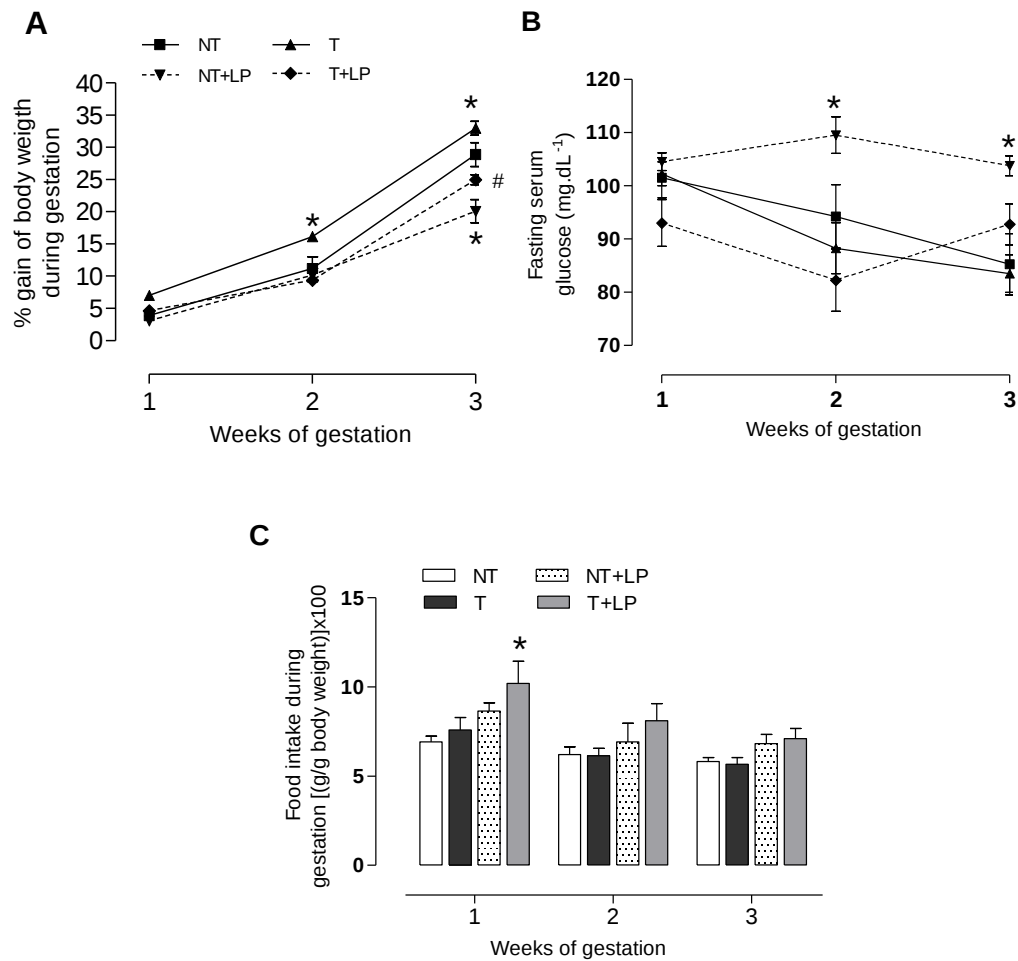


Figure 1. Gain of body weight (A), fasting blood glucose (B) and relative daily food intake (C) during gestation by non-trained (NT, n=4), trained (T, n=4), non-trained + low protein (NT+LP, n=4) and trained + low protein dams (T+LP, n=4). The values are presented as means + S.E.M. * $P < 0.05$ vs NT group, and # $P < 0.05$ vs NT + LP using two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

Table 1. Body weight, % body weight gain, body length and abdominal circumference of the offspring at 30, 60, 90, 120 and 150 days old. Pups from untrained mothers (TN_p, n=8), trained (T_p, n=8), untrained+low protein (NT+LP_p, n=8), and trained + low protein (T+LP_p, n=8). The values are presented as mean ± S.E.M.

	<i>Ages (days)</i>	NT _p			T _p			NT+LP _p			T+LP _p		
		Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
Body weight (g)	Birth	6.2	±	0.1	6.2	±	0.1	4.8	±	0.08 ^a	5.1	±	0.06 ^a
	30	86.1	±	2.1	80.0	±	2.5	38.8	±	2.1 ^a	48.6	±	2.5 ^a
	60	258.8	±	5.6	249.2	±	7.7	188.6	±	3.4 ^a	232.9	±	5.5 ^b
	90	351.4	±	8.8	342.5	±	7.3	284.9	±	9.4 ^a	329.3	±	11.7 ^b
	120	393.1	±	9.9	386.6	±	10.1	289.3	±	5.3 ^a	372.4	±	4.8 ^b
	150	421.8	±	8.6	449.3	±	3.5 ^a	343.2	±	11.3 ^a	398.5	±	1.5 ^b
% Body weight gain	Birth -30	1388.7	±	102.1	1187.2	±	112.2	708.9	±	41.9 ^a	852.2	±	51.1 ^a
	31 - 90	309.1	±	10.5	328.3	±	15.9	641.1	±	19.9 ^a	494.5	±	15.2 ^{ab}
	91-150	20.9	±	3.7	30.3	±	4.4	20.5	±	4.4	21.0	±	4.4
Body length (cm)	30	14.7	±	0.2	14.1	±	0.12	12.3	±	0.18 ^a	12.6	±	0.16 ^a
	60	20.3	±	0.2	19.7	±	0.23	18.3	±	0.18 ^a	19.5	±	0.22 ^{a,b}
	90	21.3	±	0.2	21.6	±	0.16	19.9	±	0.21 ^a	21.8	±	0.15 ^b
	120	23.2	±	0.3	22.8	±	0.28	21.1	±	0.26 ^a	22.7	±	0.15 ^b
	150	24.1	±	0.2	24.2	±	0.12	23.6	±	0.14 ^a	23.9	±	0.21
Abdominal Circumference (cm)	150	17.7	±	0.2	17.6	±	0.2	18.6	±	0.5 ^a	17.5	±	0.2 ^b

^a $P < 0.05$ vs NT_p group, and ^b $P < 0.05$ vs NT + LP_p group using two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

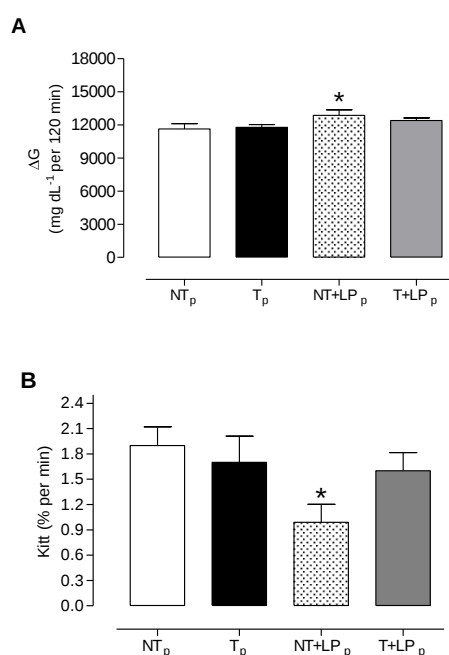


Figure 2. Glucose tolerance test (GTT) (A) and insulin tolerance test (ITT) (B) of the offspring at 145d and 147d, respectively. Pups from untrained mothers (NT_p, n=8), trained (T_p, n=8), untrained + low protein (NT+LP_p, n=8) and trained + low protein (T+LP_p, n=8) animals. The values are presented as means + S.E.M. *P<0.05 vs NT group using two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

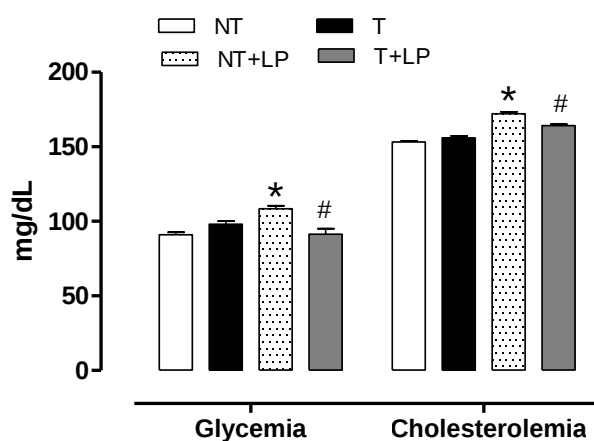


Figure 3. Fasting blood glucose and cholesterol of the offspring at 150d. Pups from untrained mothers (NT_p, n=8), trained (T_p, n=8), untrained + low protein (NT+LP_p, n=8) and trained + low protein (T+LP_p, n=8) animals. The values are presented as means + S.E.M. *P<0.05 vs NT group, and #P<0.05 vs NT + LP using two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test.

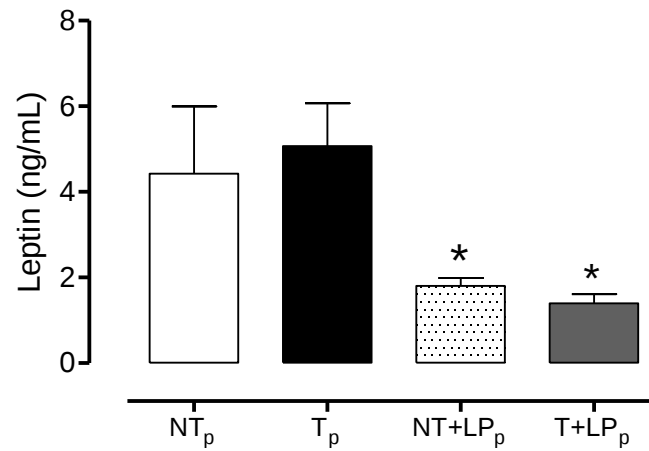


Figure 4. Plasma leptin concentration of the offspring at 150d. Pups from untrained mothers (NT_p, n=8), trained (T_p, n=8), untrained + low protein (NT+LP_p, n=8) and trained + low protein (T+LP_p, n=8) animals. The values are presented as means + S.E.M. *P<0.05 vs NT group using two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a evolução das espécies, a disponibilidade de alimentos constituiu uma intensa pressão de seleção, condicionando a morfologia, o desenvolvimento e o comportamento das espécies. Uma alimentação balanceada é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento do organismo. A falta ou deficiência de nutrientes em períodos críticos de desenvolvimento tem repercussões a curto e longo prazo (Smart e Dobbing, 1971; Ozanne e Hales, 1999). A desnutrição materna é um dos fatores determinantes de crescimento intra-uterino retardado (CIUR), o que é evidenciado por baixo ganho de peso gestacional (Barros et al., 2006).

A relação entre a nutrição no período perinatal e a repercussão na vida adulta tem sido reconhecida há várias décadas (Hales e Ozanne, 2003; Barker et al., 2002; Hales e Barker, 1992; Forsdahl, 1977; Davison e Dobbing, 1968). A falta ou deficiência de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças metabólicas associadas à obesidade (Desai et al., 1996; Barker, 1998; De Moura et al., 2005; De Moura et al., 2007). Com base nestas observações, Hales e Barker (1992) sugeriram a Hipótese do Fenótipo Pougador (*Thrifty Phenotype Hypothesis*), assumindo que o organismo se adapta a um ambiente intrauterino adverso otimizando a utilização de nutrientes em situações de sua escassez para assegurar sua sobrevivência. Alterações ambientais no início da vida imprimem um processo adaptativo, programando o animal para um fenótipo mais econômico (Hales e Barker, 1992).

De acordo com essa hipótese, a redução dos aportes nutricionais em um organismo em desenvolvimento conduz a uma “programação metabólica” que irá lhe permitir a sobrevivência em condições de restrição alimentar. Contudo, quando esse organismo é submetido à nutrição adequada ou é superalimentado, a incompatibilidade entre essa programação fisiológica e as novas condições nutricionais pode gerar doenças, tais como alteração da tolerância à glicose, hipertensão arterial e hipertrigliceridemia (Hales e Barker, 1992; Ozanne e Hales, 1999).

O nosso grupo tem observado que a desnutrição no período perinatal altera o crescimento somático, a resposta ao tratamento com antidepressivos, o comportamento agressivo, o comportamento alimentar, a morfologia da laringe, as propriedades mecânicas do músculo esquelético, a morfologia do músculo cardíaco e o padrão de atividade locomotora de ratos adultos (Barros et al., 2006; Barreto-Medeiros et al., 2004; Lopes de Souza et al., 2008; Toscano et al., 2008; Pires-de-Melo et al., 2009).

A restrição dietética de proteína durante a gestação acarreta a produção de altos níveis de glicocorticóides que pode resultar em diminuição da atividade da enzima 11β -hidroxiesteróide desidrogenase placentária (11β -HSD) tipo 2, a qual protege o feto dos altos níveis maternos de glicocorticóides. Excesso de glicocorticóides também afeta o crescimento da placenta, a transferência de nutrientes, angiogênese, invasão do trofoblasto e a produção de fatores de crescimento similar à insulina (IGFs) (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003; Clapp III et al., 2000). Esta resposta pode ser um dos mecanismos que relacionam o ambiente materno com a programação fetal. Durante o período gestacional, também ocorre maior produção dos hormônios lactogênico placentário, cortisol, progesterona, estrógeno e prolactina, os quais são antagônicos à ação da insulina e, frente a um estado de restrição alimentar, podem participar da gênese da resistência periférica a este hormônio (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003).

Recentemente, tem sido reconhecido que o estilo de vida materno influencia muitas das adaptações fisiológicas durante a gestação que podem repercutir no crescimento feto-placentário, sendo considerado um fator ambiental indutor de programação (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003; Clapp III et al., 2000). Entretanto, o benefício do exercício físico vai depender do momento da gestação, da capacidade física da gestante, do tipo, da frequência, da duração e da intensidade do treino. Estudos com humanos têm demonstrado que o treinamento físico durante a gestação aumentou a massa muscular, o débito cardíaco, a aptidão cardiorrespiratória, o volume plasmático materno de repouso, o volume de sangue no espaço intervilloso, a função placentária e a taxa de crescimento fetal (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003; Clapp III et al., 2000). O presente estudo demonstrou que o treinamento físico de intensidade leve a moderada durante a gestação elevou o consumo máximo de oxigênio (Amorim et al., 2009) o qual pode ter elevado a disponibilidade de glicose e liberação de oxigênio para a placenta (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003; Clapp III et al., 2000).

A barreira feto-placentária é uma interface importante para regulação do crescimento fetal em várias espécies animais. O mecanismo proposto, é que o trofoblasto funciona como um sensor de disponibilidade de oxigênio o qual alteraria a expressão gênica de múltiplos peptídeos indutores de crescimento (Clapp, 2006; Clapp et al., 2003; Clapp III et al., 2000). Estes, então, são liberados na circulação fetal e estimulam a produção de IGFs que vão atuar em tecidos-alvo promovendo seu crescimento. É possível que, no presente estudo, o treinamento físico tenha minimizado o impacto da desnutrição regulando a produção de IGF1 e também tenha aumentado a expressão de 11β -HSD tipo 2 na placenta favorecendo o crescimento da prole. Recente estudo demonstrou que o treinamento físico materno pode

alterar a expressão de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) os quais, por sua vez, no presente estudo podem ter preservado as estruturas craniofaciais dos neonatos (Parnpiansil et al., 2003).

O músculo esquelético representa 40% da massa corporal total e exerce papel primordial sobre o metabolismo, tornando-se um dos principais tecidos responsável pela captação, liberação e estocagem de glicose (Ozanne et al., 2005; Ropelle et al., 2005). A restrição de proteína no período perinatal está associada ao aparecimento de diabetes tipo 2 e resistência periférica à insulina no músculo de ratos adultos (>180 dias de idade) (Ozanne et al., 2005). O mecanismo proposto ainda não está bem estabelecido, mas pode ter uma associação com a elevada concentração plasmática de ácidos graxos (AG) livres, com os níveis aumentados de glicocorticóides no plasma, com o eixo GH-IGF1 (hormônio do crescimento-fatores de crescimento similar à insulina) e com as alterações na expressão de proteínas da via de sinalização intracelular da insulina no músculo (Ozanne et al., 2005; Ropelle et al., 2005). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que pode ter ocorrido uma re-programação no fenótipo metabólico de animais cujas mães foram treinadas e submetidas à dieta baixa em proteínas durante a gestação e lactação. O possível mecanismo destes efeitos pode estar relacionado com o aumento de proteínas-chave na cascata de sinalização intracelular da insulina (Ozanne et al., 2005).

É possível especular que, nos países em desenvolvimento, onde mulheres desenvolvem altas rotinas diárias de trabalho e não há superalimentação pós-natal, essas estratégias podem ser decisivas para a não instalação da síndrome metabólica (Rao et al., 2003). Em resumo, uma dieta com pouca proteína durante a gestação e lactação está associada com consequências adversas permanentes sobre órgãos e sistemas fisiológicos. Em contrapartida, o treinamento físico de intensidade leve a moderado durante a gestação pode ser um estímulo não-adverso de re-programação fetal. Além disso, os efeitos induzidos por dietas hipoproteicas durante o período crítico do desenvolvimento sobre o metabolismo podem ser atenuados ou revertidos pelo treinamento físico.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- A desnutrição perinatal reduz os indicadores de crescimento e acarreta hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipoleptinemia na prole na idade adulta.
- O protocolo de treinamento físico aumenta o consumo máximo de oxigênio e interfere positivamente na homeostase glicêmica das fêmeas, induz aumento das dimensões cranianas de ratos neonatos, incrementa o crescimento e é capaz de reverter o status metabólico da prole na idade adulta.

PERSPECTIVAS

Foram levantadas novas hipóteses e sugeridas algumas perspectivas para continuação deste estudo, entre as quais:

- Verificar a concentração de glicocorticóides e leptina sérica e no cordão umbilical de mães que treinaram e foram submetidas à desnutrição durante a gestação.
- Investigar a influência do treinamento físico sobre a secreção de hormônios gestacionais de mães que foram submetidas à desnutrição durante o período perinatal.
- Avaliar, em músculos de contração rápida e lenta e nos adipócitos de ratos com 150 dias, o conteúdo de RNAm, a expressão e ativação de proteínas-chave envolvidas na cascata de sinalização intracelular da leptina e da insulina.
- Avaliar a concentração de glicogênio e triglicerídios intramusculares em músculos de contração rápida e lenta de ratos com 150 dias cujas mães foram submetidas ao treinamento físico antes e durante a gestação e à desnutrição durante a gestação e lactação.
- Avaliar a quantidade de tecido adiposo na carcaça de ratos com 150 dias cujas mães foram submetidas ao treinamento físico antes e durante a gestação e à desnutrição durante a gestação e lactação.
- Realizar todas as análises em músculos e adipócitos de ratos e ratas com 180 dias de vida.
- Estudar, em crianças com histórico de desnutrição perinatal, a influência da atividade física materna durante a gestação sobre a programação fetal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Amorim, M.F.; Santos, J.A.; Hirabara, S.M.; Nascimento, E.; Lopes-de-Souza, S.; Manhães-de-Castro R, et al. Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? **Exp Physiol**, v. 94, p. 906–913, 2009.

Amorim, M.A.F. **Desnutrição experimental e treinamento físico: estudo de parâmetros murinométricos de ratas gestantes e dos conceptos**. Recife: 2006. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal de Pernambuco, Nutrição, 2006.

Barker, D.J.P. In utero programming of chronic disease. **Clin. Sci**, v. 95. p. 115-128, 1998.

Barker, D.J.P.; Eriksson, J.G.; Osmond, C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**. v. 31. p. 1235-1239, 2002.

Barreto-Medeiros, J.M.; Feitoza, E.G.; Magalhaes, K.; Cabral-Filho, J.E.; Manhaes-De-Castro F.M.; De-Castro C.M.; Manhães-de-Castro R. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. **Nutr Neurosci**. v. 7. p. 49-52, 2004.

Barros, K.M.F.T.; Manhães-de-Castro, R.; Lopes-de-Souza, S.; Matos, R.J.B.; Deiró, T.C.B.J.; Cabral-Filho, J.E.; et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci**, v. 9, p. 99-104, 2006.

Bayol, S.; Jones, D.; Goldspink, G.; Stickland, N.C. 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, p. 331–339, 2004.

Bedford, T.G.; Tipton, C.M.; Wilson, N.C.; Oppliger, R.A.; Gisolfi, C.V. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. **J Appl Physiol: Respirat Environ Exerc Physiol**, v. 47. p. 1278–1283, 1979.

Bernardis, L.L.; Petterson, B.D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinology**, v. 40, p. 527-528, 1968.

Brooks, G.A.; White, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol: Respirat Environ Exerc Physiol**, v. 45, p.1009–1015, 1978.

Carballada, R.; Esponda, E.P. Fate and distribution of seminal plasma proteins in the genital tract of the female rat after natural mating. **J Reprod Fertil**, v. 109, p. 325-335, 1997.

Clapp, J. F. Effects of diet and exercise on insulin resistance during pregnancy. **Metab Syndr Relat Disord**. v. 4. p. 84-90, 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. p. S80-85, 2003.

Clapp III, J.F.; Kim, H.; Burciu, B.; Lopez, B. Beginning regular exercise in early pregnancy: Effect on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**. v. 183. p. 1484-1488, 2000.

Clapp III, J.F. Exercise during pregnancy. A clinical update. **Clin. Sports Med.**, v.19. p. 273-286, 2000.

De Moura, E. G.; Lisboa, P.C. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. **J Nutr Biochem**. v. 18. p. 134-139, 2007.

De Moura, E. G.; Passos, M.C.. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Biosci Rep**, v. 25. p. 251-269, 2005.

Desai, M.; Crowther, N.J.; Lucas, A.; Hales, N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **British Journal of Nutrition**. v. 76. p. 591-603, 1996.

Dobbing, J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davison, A.N.; Dobbing, J. **Applied Neurochemistry**, p. 287-316, 1968.

Forsdahl, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic disease? **Br. J. Prev. Soc. Med.**, v. 31. p. 91-95, 1977.

Hales, C.N.; Barker, D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35. p. 595-601, 1992.

Hales, C.N.; Ozanne, S.E. The dangerous road of catch-up growth. **Journal of Physiology**, v. 547.1, p. 5-10, 2003.

Leandro, C.G.; Levada, A.C.; Hirabara, S.M.; Manhaes-de-Castro, R.; De-Castro, C.B.; Curi, R.; Pithon-Curi, T.C. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, v. 21, p. 751–756, 2007.

Le Floch, J.P.; Escuyer, P.; Baudin, E.; Baudon, D.; Perlemuter, L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. **Diabetes Care**, v. 13, p. 172-175, 1990.

Lopes de Souza, S.; Orozco-Solis, R.; Grit, I.; Manhães de Castro, R.; Bolãnos-Jiménez, F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, p. 1400-1408, 2008.

Lundbaek, K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v. 3, p. 1057-1063, 1962.

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, p. 609-614, 2002.

Mathews, J.N.S.; Altman, D.G.; Campbell, M.J.; Royston, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br Med J**, v. 27, p. 230-235, 1990.

Novelli, E.L.B.; Diniz, Y.S.; Galhardi, C.M.; Ebaid, G.M.X.; Rodrigues, H.G.; Mani, F.; Fernandes, A.A.H.; Cicogna, A.C.; Novelli Filho, J.L.V.B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111–119, 2007.

Ozanne, S.E.; Jensen, C.B.; Tingey, K.J.; Storgaard, H.; Madsbad, S.; Vaag, A.A. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**, v. 48, p. 547-552, 2005.

Ozanne, S.E.; Hales, C.N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. **Nutrition Society**, v. 58, p. 615-619, 1999.

Parnpiansil, P.; Jutapakdeegula, N.; Chentanezb, T.; Kotchabhakdia, N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. **Neuroscience Letters**, v. 352, p. 45-48, 2003.

Pires-De-Melo, I. H.; Wanderley Dos Reis, F. Short- and long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the morphology of the larynx. **Nutrition**, v. 25. p. 855-860, 2009.

Rao, S.; Kanade, A.; Margetts, B.M.; Yajnik, C.S.; Lubree, H.; Rege, S.; Desai, B.; Jackson, A.; Fall, C.H.D. Maternal activity in relation to birth size in rural India. The Pune Maternal Nutrition Study. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 57. p. 531–542, 2003.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.J.R. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diets. **Journal Nutrition**, v. 123, p.1939-1951, 1993.

Ropelle, E.R.; Pauli, J.R.; Carnevalheira, J.B.C. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. **Motriz**. v. 11. p. 49-55, 2005.

Silva, H.J.; Marinho, S.M.O.C.; Toscano, A.E.; Albuquerque, C.G.; Moraes, S.R.A.; Manhães-de-Castro, R. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. **Int J Morphol**, v. 23, p. 227-230, 2005.

Smart, J.L.; Dobbing, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**. v. 28. p. 85-95, 1971.

Taylor, C.R.; Weibel, E.R.. Design of the mammalian respiratory system I-IX. **Respir Physiol**, v. 44, p.1-164, 1981.

Toscano, A. E.; Amorim, M.A.; Carvalho Filho, E.V.; Aragão, R.S.; Cabral-Filho, J.E.; Moraes, S.R.A.; Manhaes-De-Castro, R. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sci**, v. 82. p. 1131-1136, 2008.

Toscano, A. E.; Manhaes-De-Castro, R.; Canon, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24. p. 270-278, 2008.

ANEXOS

ANEXOS

- ANEXO A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- ANEXO B Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- ANEXO C Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos” ao periódico Revista Brasileira de Medicina do Esporte
- ANEXO D Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Maternal moderate physical training re-programs the effect of a perinatal low-protein diet in adult offspring” ao periódico The Journal of Physiology

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, 100
50670-420 - Recife - PE - Brasil
telefone: (51) 2124-6540 | (51) 2124-6500
fax: (51) 2124-6599
www.ufpe.br



Ofício nº 08/06

Recife, 16 de março de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Prof. Raul Manhães de Castro
Departamento de Nutrição - UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado “Gestação, treinamento de resistência aeróbica e desnutrição: estudo de indicadores somáticos de fêmeas e da sua prole”.

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

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

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

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
03.06.2006
Aprova
Prof. Raul Manhães de Castro
Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Ofício nº 99/07

Recife, 19 de setembro de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Carol Virgínia Góis Leandro**
Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE
Processo nº 008676/2007-48

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“INDUÇÃO DE PROGRAMAÇÃO FETAL PELA DESNUTRIÇÃO E PELO TREINAMENTO EM RATOS: ESTUDO DE PARÂMETROS SOMÁTICOS, NEUROMOTORES E BIOQUÍMICOS DE FÊMEAS E DA SUA PROLE”**.

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

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

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

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

APOL

ANEXO C – Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos” ao periódico Revista Brasileira de Medicina do Esporte

[RBME] Agradecimento pela Submissão

De: **Fernanda Colmatti** (atharbme@uol.com.br)

Enviada: quarta-feira, 11 de novembro de 2009 18:07:58

Para: Marco Antônio Fidalgo Amorim (marcofidalgo1@hotmail.com)

Dr. (a) Marco Antônio Fidalgo Amorim,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos" para Revista Brasileira de Medicina do Esporte. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbme/author/submission/21671>

Login: marcofidalgo

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Fernanda Colmatti

Revista Brasileira de Medicina do Esporte

Fernanda Colmatti/Arthur T. Assis

Atha Comunicação e Editora

Tel/Fax:55-11-5579-5308

Revista Brasileira de Medicina do Esporte

<http://submission.scielo.br/index.php/rbme>

ANEXO D – Comprovante de encaminhamento do manuscrito “Maternal moderate physical training re-programs the effect of a perinatal low-protein diet in adult offspring” ao periódico The Journal of Physiology