



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

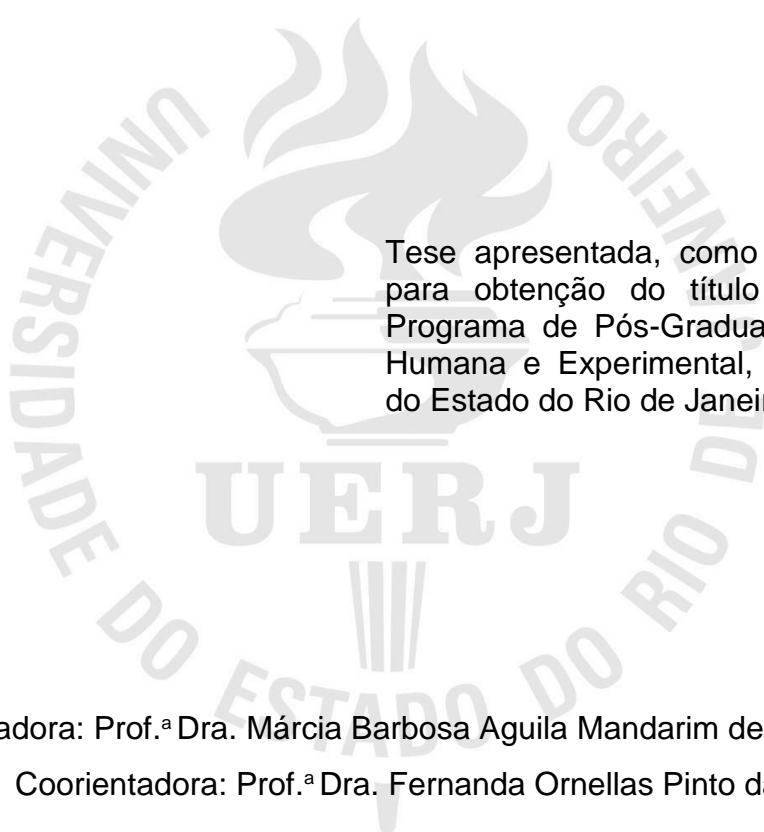
Renata Tarevnic

**Impacto da natação materna na prole de pai obeso:  
estudo experimental**

Rio de Janeiro  
2019

Renata Tarevnic

**Impacto da natação materna na prole de pai obeso: estudo experimental**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Aguilá Mandarim de Lacerda

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

T184 Tarevnic, Renata.  
Impacto da natação materna na prole de pai obeso: estudo experimental / Renata Tarevnic. – 2019.  
59 f.

Orientadora: Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda  
Coorientadora: Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) –  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia  
Roberto Alcântara Gomes.

1. Obesidade – Teses. 2. Exercícios físicos – Teses. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Fígado – Teses. 5. Metabolismo – Teses. 6. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Mandarin-de-Lacerda, Márcia Barbosa Águila. II. Cruz, Fernanda Ornellas Pinto da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB/7 - 4780

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Renata Tarevnic

**Impacto da natação materna na prole de pai obeso: estudo experimental**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de setembro de 2019.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Matsuura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Fabrizio di Masi

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida família e amigos, sem os quais eu não teria forças para prosseguir no caminho da busca do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

À minha família por todo carinho, paciência, palavras de incentivo e AMOR. Obrigada por tudo.

Aos professores Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda por terem propiciado meu crescimento intelectual e pessoal. Obrigada pela oportunidade de passar períodos de grande aprendizado nesta jornada do doutorado.

À minha amiga e família Cristina Maria Henriques Senra pela amizade, estímulo e parceria. Tinoca, a tua presença ao meu lado me deu confiança para alcançar alturas maiores. Agradeço também aos amigos aquáticos pela inspiração, pelo carinho e atenção dispensados em muitos momentos.

A minha coorientadora e amiga Fernanda Ornellas pela grande parceria, acolhimento e dedicação em muitos ensinamentos ao longo dessa jornada. Fê tenho a certeza que construímos um grande trabalho e dele nasce uma nova amizade para SEMPRE. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos amigos, Thatiany Marinho, Tamiris Ingrid, Byanca, Filipe, Aline Penna, Priscila Carapeto, Flavia e todos do LMMC. Foram vocês que iluminaram este laboratório com a alegria, responsabilidade e amizade infindáveis. Agradeço pelas palavras de carinho, estímulo e risadas, as quais tornaram o caminho mais leve e agradável.

Aos meus estagiários de iniciação científica Alexandre, Tatiana e Wellington pelo companheirismo e confiança. Obrigada por me permitirem transmitir o que outrora aprendi.

Aos companheiros do LMMC pelas trocas de conhecimentos e experiências, pois aprendemos que durante a longa caminhada científica cada passo não é dado de forma solitária, mas sim em conjunto e em parceria a fim de uma grande evolução contínua.

À técnica Michele Soares, por toda assistência durante o desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas amigas inseparáveis da vida, que foram fundamentais para o meu desenvolvimento: Dilamar Carvalho, Alice Guedes, Dalia, Tania, Verinha, Isabel e Graça, as amigas de Pedro II e LAFISAEF (Prof Silvio, Prof<sup>a</sup> Lucia e Prof<sup>a</sup> Jerusa).

Amo vocês!

Vencer a si próprio é a maior das vitórias

*Platão*

## RESUMO

TAREVNIC, Renata. **Impacto da natação materna na prole de pai obeso**: estudo experimental. 2019. 59 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

O estilo de vida e a nutrição dos pais podem programar o metabolismo da prole e a obesidade na vida adulta. Investigamos se a atividade materna durante a gravidez pode modificar os efeitos adversos hepáticos na prole causados pelo pai obeso. Camundongos C57BL / 6 machos com quatro semanas de idade foram alimentados com dieta hiperlipídica (pai obeso, ObP) ou dieta controle (pai controle, CP), enquanto as fêmeas foram alimentadas com dieta controle. Com 12 semanas de idade, os animais foram acasalados, as mães foram treinadas (TM) ou não treinadas (NTM): nadando por seis semanas antes do acasalamento e duas semanas durante a gestação. Os filhotes foram alimentados com dieta controle após o desmame até doze semanas de idade, época que foram sacrificados; eles foram nomeados de acordo com a dieta do pai e o exercício da mãe. A massa corporal final (MC) foi 20% maior no ObP que no CP. Os filhotes apresentaram: a) ganho de gordura corporal e adiposidade alterada no sexo masculino, b) glicemia de jejum elevada e alto nível de insulina no ObP / NTM e ObP / TM, c) esteatose hepática aumentada no ObP / NTM vs. CP / NTM e ObP / TM vs. CP / TM, porém menor quantidade de esteatose hepática no grupo ObP / TM vs. ObP / NTM, d) aumento da lipogênese e redução da beta-oxidação no grupo ObP / NTM vs. CP / NTM, o oposto em ObP / TM vs. ObP / NTM, e) inflamação acentuada no fígado em ObP / NTM vs. CP / NTM, e diminuição da inflamação no grupo ObP / TM vs. ObP / NTM. O pai obeso programou os filhotes para uma adiposidade aumentada e metabolismo alterado da glicose e insulina na prole. Além disso, o pai obeso possibilitou maior lipogênese, inflamação e diminuição da beta-oxidação no fígado dos filhotes. A mãe treinada durante a gravidez (natação) pode atenuar esses efeitos adversos nos filhotes.

Palavras-chave: Programação paterna. Natação materna. Fígado. Gravidez.

## ABSTRACT

TAREVNIC, Renata. **Impact of maternal swimming on offspring of obese father**: experimental study. 2019. 59 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Parental lifestyle and nutrition can program offspring metabolism and obesity in later life. We investigated whether maternal activity during pregnancy can modify the adverse liver effects on offspring caused by the obese father. Four-week-old C57BL/6 mice were fed either a high-fat diet (obese parent, ObFa) or a control diet (control parent, CFa), while females were fed a control diet. At 12 weeks of age, the animals were mated, mothers were trained (TM) or untrained (NTM): swimming for six weeks before and two weeks during pregnancy. The pups were fed a control diet after weaning until sacrifice; they were named according to the exercise of father and mother. The final body mass (BM) was 20% higher in ObFa than in CFa. Offspring at 12 weeks of age had: a) body fat gain and altered adiposity in males, b) high fasting blood glucose and high insulin level in ObFa / NTMo, but low in ObFa / TMo, c) marked liver steatosis in ObFa / NTMo vs. CFa / NTMo and ObFa / TMo vs. CFa / TMo, but less liver steatosis in ObFa / TMo vs. ObFa / NTMo, d) increased lipogenesis and reduced beta-oxidation in ObFa / NTMo vs. CFa / NTMo, but the opposite in ObFa / TMo vs. ObFa / NTMo, e) high liver inflammation in ObFa / NTMo vs. CFa / NTMo, but low inflammation in ObFa / TMo vs. ObFa / NTMo. The obese father programmed increased adiposity and altered metabolism (glucose and insulin sensitivity) in the offspring. In addition, the obese father increased lipogenesis and liver inflammation with decreased beta-oxidation and thus hepatic steatosis in the progeny. The active mother during pregnancy (swimming) can alleviate these adverse effects on the offspring of mice.

Keywords: Paternal programming. Maternal swimming. Liver. Pregnant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo dos efeitos da obesidade paterna na função espermática..	18
Figura 2 - Representação resumida dos diferentes mecanismos epigenéticos e principais processos subjacentes que regulam a expressão gênica.	19
Figura 3 - Fatores de risco que podem afetar a programação paterna.....	20
Figura 4 - Esquema da formação dos grupos experimentais.....	26
Figura 5 - Esquema do protocolo de natação experimental usado no estudo...	29
Figura 6 - Evolução da massa corporal dos animais.....	36
Figura 7 - Dados da prole: adiposidade e ganho ponderal.....	39
Figura 8 - Dados da prole: glicemia jejum, insulina e QUICKI.....	40
Figura 9 - Dados da prole: TG hepático e massa do fígado.....	42
Figura 10 - Dados da prole: fotomicrografias do fígado.....	43
Figura 11 - Expressão proteica da prole: SREBP-1, PPAR $\alpha$ e PPAR.....	44
Figura 12 - Expressão gênica da prole <i>Srebp-1</i> , <i>Fas</i> , <i>Cpt-1</i> e <i>Ppar<math>\gamma</math></i> .....	44
Figura 13 - Expressão proteica da prole NF $\kappa$ $\beta$ , SOCS3.....	45
Figura 14 - Expressão proteica da prole TNF $\alpha$ e IL6.....	46
Figura 15 - Expressão proteica e gênica da prole IL1 $\beta$ e IL6.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais .....	27
Tabela 2 -	Primers .....	32
Tabela 3 -	Dados biométricos dos progenitors .....	36
Tabela 4 -	Dados biométricos e bioquímicos da prole .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sob a curva
C	Controle
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase
CT	Colesterol Total
DCV	Doenças cardiovasculares
DHEG	Doença Hipertensiva específica da gestação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOHAD	Desenvolvimento da saúde e doença
DP	Desvio padrão
IE	Ingestão energética
f	fêmea
FAS	Ácido graxo sintetase
GI	Glicemia de jejum
IA	Ingestão alimentar
HL	Dieta hiperlipídica
HIIT	High intensity interval training (treinamento intervalado de alta intensidade)
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
m	macho
MC	Massa corporal
NFK $\beta$	Fator nuclear kappa beta
NT	Não realizou treinamento de natação
Ob	Obeso
Pp	Pontos parciais
PPAR	Ativador de proliferação peroxissomal
Pt -	Pontos totais
RNA	Ácido ribonucléico

SNC	Sistema nervoso central
SOCS3	Proteína supressora de sinalização de citocina 3
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento regulador do estero
T	Realizou treinamento de natação
TAG	Triacilglicerol
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste de tolerância oral a glicose
VO <sub>2</sub> máx	Capacidade máxima de oxigênio armazenado
Vv	Densidade de volume

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>Programação paterna</b> .....	17
1.2	<b>Exercício Físico na gravidez</b> .....	21
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	<b>Gerais</b> .....	24
2.2	<b>Específicos</b> .....	24
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	25
3.2	<b>Massa corporal, ingestão alimentar e energética</b> .....	27
3.3	<b>Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose</b> .....	28
3.4	<b>Protocolo de exercício físico (natação)</b> .....	28
3.5	<b>Eutanásia, glicemia de jejum insulina</b> .....	30
3.6	<b>Fígado: triacilglicerol e esteatose</b> .....	31
3.7	<b>qPCR do fígado</b> .....	31
3.8	<b>Western Blotting do fígado</b> .....	33
3.9	<b>Análise estatística</b> .....	34
4	<b>RESULTADOS</b> .....	35
4.1	<b>Dados dos progenitores</b> .....	35
4.2	<b>Dados da prole</b> .....	37
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	57
	<b>ANEXO B- Primeiro artigo publicado</b> .....	58
	<b>ANEXO C - Confirmação de submissão do segundo artigo</b> .....	59

## INTRODUÇÃO

“Programação fetal” é o processo pelo qual fatores parentais, além dos genéticos, podem determinar insultos atuantes no início da vida que tem potencial de influenciar na saúde da prole na idade adulta. “Programação fetal” é o mecanismo principal que induz o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus do tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e outras modificações metabólicas na prole (Barker, 1995; Langley-Evans, 2009).

O impacto negativo da obesidade materna sobre a adiposidade e o metabolismo da prole está bem estabelecido na literatura, inclusive com estudos de nosso laboratório na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Bringhenti *et al.*, 2013; Ornellas *et al.*, 2013; Bringhenti *et al.*, 2015). Mudanças no metabolismo da mãe durante a gestação podem afetar o desenvolvimento placentário e embrionário, culminando em alteração do influxo de nutrientes via placenta para o feto e influenciando o crescimento e resultando em adaptações irreversíveis na estrutura e função de órgão e sistemas, como fígado e sistema nervoso central da prole (Bruce *et al.*, 2009; Gregorio *et al.*, 2010; Volpato *et al.*, 2012).

Experimentos com animais aprofundaram no conhecimento sobre “programação fetal”, indicando que há algo mais em ação, particularmente induzido pela linha paterna. Portanto, a obesidade dos pais pode afetar negativamente na fertilidade, gravidez e saúde de filhos de ambos os sexos.

Além dos primeiros relatos de que crianças que recebem um polimorfismo paterno ligado à expressão transformada do gene da insulina têm um risco aumentado de desenvolver obesidade precoce (Frankish, 2001; Le Stunff *et al.*, 2001), outros relataram, em mamíferos, uma comunicação não genética e intergeracional, de alterações metabólicas da obesidade induzida por dieta do pai para a prole (Ng *et al.*, 2010; McPherson *et al.*, 2014; Ornellas *et al.*, 2018). Na programação paterna, a epigenética é o mecanismo primário envolvido na transmissão fenotípica, onde qualquer modificação transmissível e reversível na expressão gênica, ocorre sem alteração estrutural na sequência de bases do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Heard e Martienssen, 2014; Portha *et al.*, 2019).

A contribuição paterna influenciando na prole ainda é um conhecimento “novo”, mas consistente, com a indicação que os pais têm um papel significativo na

“programação” dos filhotes, particularmente quanto aos fatores não-genéticos (Ornellas *et al.*, 2015, 2016). Este ponto é relevante, uma vez que cerca de 70% dos homens na sociedade ocidental em idade reprodutiva estão obesos ou com sobrepeso (McPherson *et al.*, 2015). Isso se associa com o número crescente de crianças “programadas” com riscos aumentados de doenças crônicas na vida adulta (Hur *et al.*, 2017).

Se sabemos que o estado nutricional dos pais pode afetar a vida pós-natal das proles, os mecanismos que podem elucidar estas observações são, ainda, pouco conhecidos. Contudo, há consenso que o mecanismo de base para a “programação” fenotípica da prole é epigenética, que pode se dar por duas vias principais (McPherson *et al.*, 2014):

- a) acúmulo de danos no DNA dos espermatozoides, resultando em mutações no embrião;
- b) alterações epigenéticas nos espermatozoides (micro RNA, metilação ou acetilação), alterando o acesso, transcrição e tradução de genes derivados do pai durante a embriogênese inicial.

Homens obesos têm remodelamento da metilação do DNA no esperma, em locais do genoma que controlam o apetite. Isso demonstra que o epigenoma do espermatozoide humano pode ser alterado pelo meio ambiente (Donkin *et al.*, 2016). Consequentemente, começamos a entender como a obesidade dos pais pode levar a alteração na próxima geração.

Estudos experimentais prévios em nosso laboratório demonstraram que a obesidade paterna tem o potencial de afetar o hipotálamo da prole levando a inflamação no local (Ornellas *et al.*, 2016). Pais obesos também provocam dano hepático na prole, caracterizado por esteatose, mesmo quando os filhotes se alimentam com dieta padrão durante toda a sua vida pós-natal, comprovando que tal como a mãe, o pai também pode impactar a saúde dos filhos (Ornellas *et al.*, 2015).

O exercício físico é uma atividade essencial para a prevenção e tratamento coadjuvante de obesidade e diabetes do tipo 2, pois melhora o metabolismo energético desequilibrado, a utilização da glicose e a sensibilidade à insulina (Cotman *et al.*, 2007). Durante a gravidez, a tendência de adotar um estilo de vida saudável auxilia no controle do ganho de massa corporal e melhora a saúde cardiovascular (Siti *et al.*, 2019).

Os efeitos do exercício físico na gravidez são comprovados na prole com

controle da massa corporal ao nascimento, e fenótipo da prole que mostra melhor tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina (Harris *et al.*, 2018). Também, filhotes machos, netos de animais fisicamente ativos (portanto, F2), foram mais eficientes metabolicamente, sugerindo melhora no fenótipo da prole por alterações epigenéticas em células germinativas masculinas induzidas pelo exercício físico (Murashov *et al.*, 2016). Entretanto, os mecanismos moleculares relacionados aos benefícios observados ainda não são bem entendidos (Raipuria *et al.*, 2015).

No presente estudo, a obesidade paterna foi induzida por dieta hiperlipídica durante oito semanas antes do acasalamento. Durante o mesmo período, as fêmeas receberam dieta controle e foram submetidas ao treinamento com natação antes da gestação. Depois todos os filhotes foram analisados na idade adulta. Testamos a hipótese de o exercício físico materno ser eficaz na atenuação ou reversão dos efeitos adversos da “programação paterna” sobre a prole.

Essa é a maior contribuição do estudo, caracterizando como a saúde do pai pode influenciar na saúde do filho, e que a prática de exercícios físicos pela mãe pode ser benéfica reduzindo os efeitos da “programação fetal” induzida pelo pai.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Programação paterna

A obesidade atinge cerca de 70% dos homens, com efeitos negativos sobre a fertilidade dos pais e a saúde da prole (McPherson *et al.*, 2014; Hur *et al.*, 2017). No geral, há consenso de que a obesidade masculina altera a produção dos hormônios sexuais, composição molecular e função de espermatozoides, com redução dos níveis de testosterona e da globulina ligante de hormônios sexuais, com aumento dos níveis de estrogênio e prejudicando diretamente a espermatogênese (Figura 1) (McPherson *et al.*, 2014).

Aqui vamos aprofundar a definição de “programação fetal”, como sendo o fenômeno pelo qual um insulto ou dano sofrido durante um período crítico do desenvolvimento, como gestação e/ou lactação, tem como consequência a alteração do padrão de crescimento e formação de órgãos vitais, resultando em alterações estruturais, fisiológicas e metabólicas permanentes (Barker, 1995; Barker e Clark, 1997). Indivíduos “programados”, quando adultos, podem ter consequências irreparáveis e irreversíveis, mesmo havendo interrupção do estímulo desencadeante do mecanismo adaptativo (Lucas, 1991).

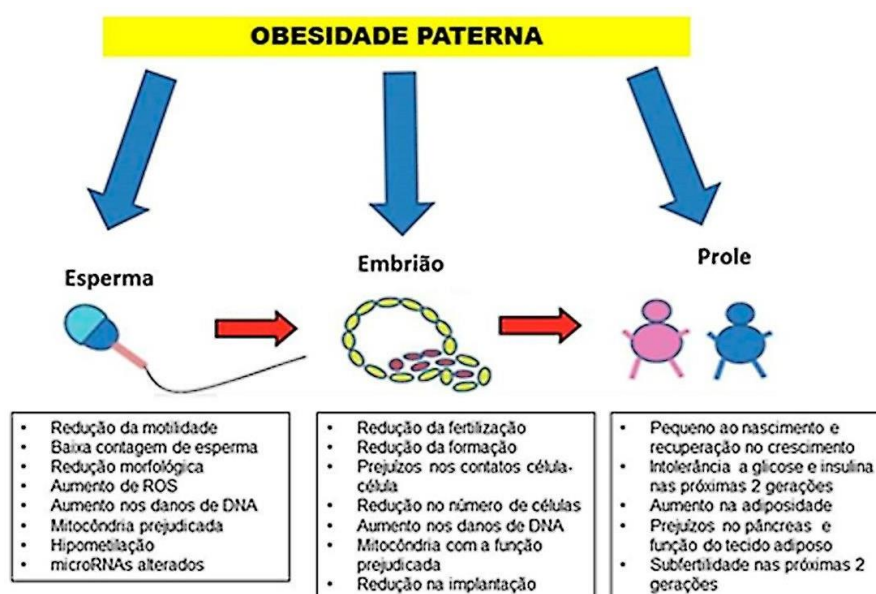
A “hipótese da programação fetal” foi sugerida originalmente pelo epidemiologista inglês David Barker, que apontou a pobreza, má nutrição e saúde debilitada das mães associadas à mortalidade infantil e maior risco de doenças cardíacas ao longo da vida dos filhos (Barker e Osmond, 1986). Logo após, estudos de coortes detalharam a relação entre baixa massa corporal ao nascer e subsequente doença cardiovascular no adulto (Barker *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1993). Essa chamada “hipótese de Barker” tem sido amplamente confirmada experimentalmente e em humanos (Li *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, muitas evidências apoiaram a hipótese da DOHAD (na sigla em inglês que significa *Developmental Origins of Health and Disease*), “programação do fenótipo fetal” sem alterar o genótipo. Estas modificações hereditárias na expressão gênica ocorrem através da metilação do DNA,

modificação de histonas e ativação ou silenciamento de genes associados ao RNA codificador -- todos são modificações epigenéticas (Figura 2) (Goyal *et al.*, 2019).

A “programação fetal de origem paterna” significa que insultos provenientes do pai também são capazes de causar danos nos filhos quando adultos. Os principais fatores de risco que podem atuar potencialmente na “programação pelo pai” são a obesidade e o diabetes do tipo 2 (Figura 3) (Li *et al.*, 2016).

**Figura 1:Obesidade Paterna**



Um resumo dos efeitos da obesidade paterna na função espermática, subsequente desenvolvimento embrionário precoce, e comprometimento da saúde dos filhos.

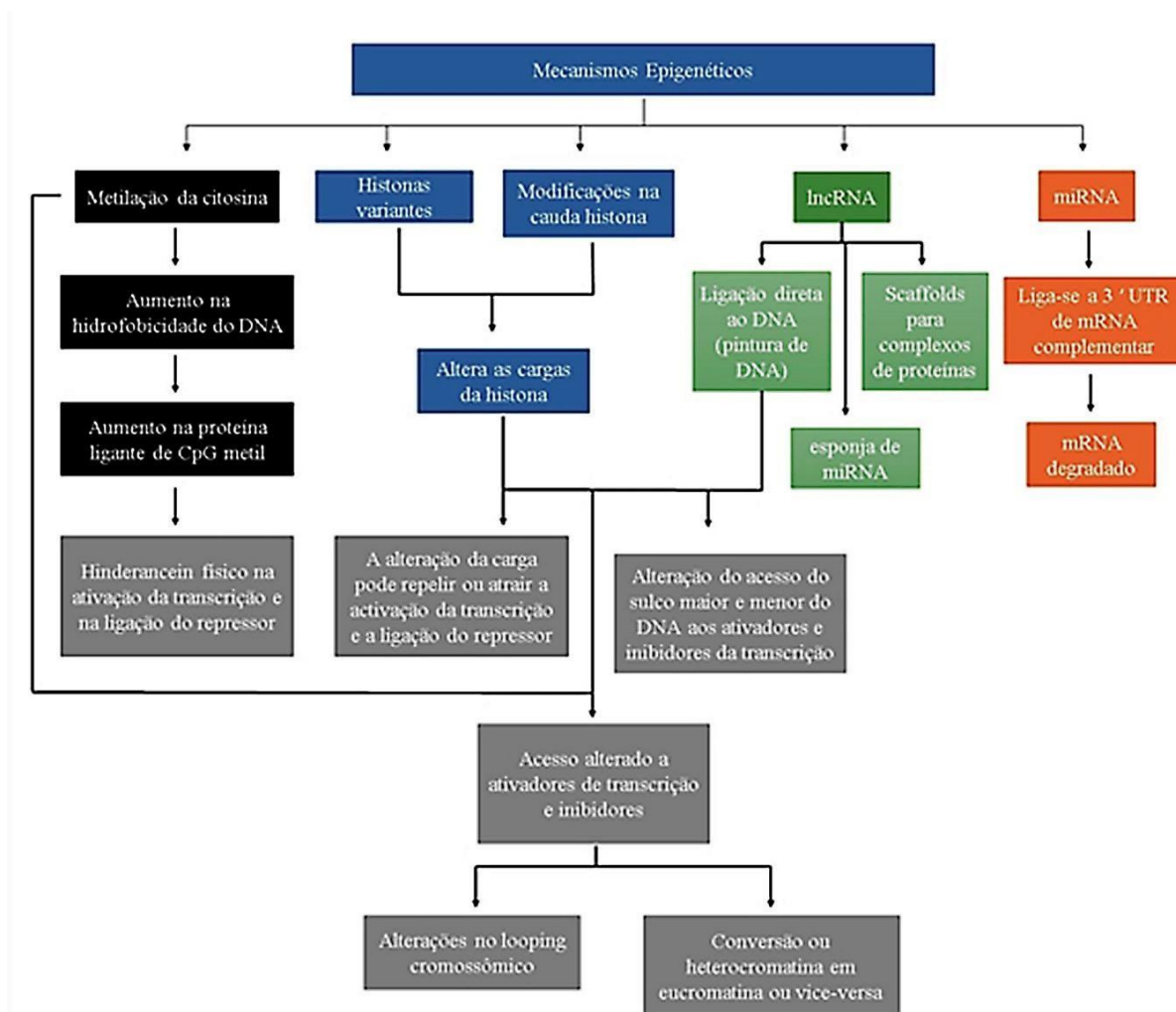
A obesidade paterna altera tanto a estrutura quanto a composição molecular dos espermatozoides, prejudicando o desenvolvimento embrionário e reduzindo as taxas de nascidos vivos (modelos animais e humanos), e em modelos animais os descendentes resultantes têm um risco aumentado de síndrome metabólica e subfertilidade que se estende por duas gerações seguintes (baseado em McPherson *et al.*, 2014).

Os mecanismos moleculares e fisiopatológicos da “programação pelo pai” ainda permanecem pouco conhecidos (Li *et al.*, 2016) e inúmeras perguntas permanecem ainda sem resposta:

- Como os fatores ambientais atuam no processo de maturação das células espermáticas no organismo?

- b) Qual o(s) estágio(s) da maturação das células espermáticas é(são) suscetíveis a fatores ambientais?
- c) Como são as alterações no desenvolvimento de espermatozoides capazes de transferência às gerações subsequentes e alterar o fenótipo dessas gerações?

**Figura 2:** Mecanismos Epigenéticos



Representação resumida dos diferentes mecanismos epigenéticos e principais processos subjacentes que regulam a expressão gênica. Fonte: (Li *et al.*, 2016).

A complexidade dos problemas se potencializa na consideração de que o estado epigenético pode ser interrompido pelas influências ambientais da mãe como uma dieta com privação de proteínas ou excesso energético (Goyal *et al.*, 2019).

**Figura 3:**Obesidade e superalimentação



Fatores de risco que podem afetar a programação paterna. Fonte: (Li *et al.*, 2016).

A contribuição do pai no metabolismo dos descendentes foi avaliada em um estudo experimental sob os efeitos intergeracionais do estresse metabólico em roedores machos (Hur *et al.*, 2017). Na primeira geração (F1), uma dieta rica em gordura foi usada para induzir a obesidade em ratos machos e os futuros pais: a prole feminina apresentou menor tolerância de glicose à menor sensibilidade à insulina e redução do número de ilhotas pancreáticas e células  $\beta$ . Já na segunda geração (F2), os camundongos machos foram expostos a uma dieta rica em proteínas e baixo teor de açúcar, do desmame à maturação sexual, e sua prole exibiu aumento significativo na expressão hepática de genes envolvidos na biossíntese de lipídios e colesterol, juntamente com a desregulação de muitas classes de lipídios do fígado (Hur *et al.*, 2017). Outro estudo com administração de dieta hiperlipídica aos pais por oito semanas antes da concepção (camundongos C57BL/6) causou aumento de reguladores da lipogênese hepática, SRBP1c e FAs. Em consequência, os descendentes F1 apresentaram fenótipos com intolerância à glicose, aumento da lipogênese e redução da beta-oxidação mitocondrial com aumento de esteatose hepática (Watkins e Sinclair, 2014).

## 1.2 Exercício físico na gravidez

A prevalência de complicações na gravidez, como diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, hipertensão gestacional e recém-nascido com macrosomia tem aumentado regularmente, provavelmente como consequência da maior frequência de obesidade materna. O exercício físico tem sido proposto como medida preventiva ou terapêutica para reduzir as complicações e melhorar a saúde materno-fetal na gravidez (Mottola *et al.*, 2018).

A prática regular do exercício físico na gravidez é recomendada para manter um estilo de vida mais saudável, auxiliando na saúde da prole. Também melhora o metabolismo materno, a vascularização e o crescimento placentário, o estresse oxidativo e a função das células endoteliais (Gaeini *et al.*, 2017). Durante a gestação de camundongos, o exercício físico materno pode desempenhar um papel vital na prevenção de doenças crônicas na prole (Harris *et al.*, 2018). O exercício físico em intensidade moderada favorece mudanças benéficas no sistema musculoesquelético e diminuição da adiposidade na prole masculina de camundongos (Gaeini *et al.*, 2017). Portanto, o exercício físico materno pode ser considerado uma intervenção capaz de influenciar positivamente o ambiente intrauterino e melhorar a saúde metabólica da prole (Harris *et al.*, 2018).

Entretanto, alguns riscos podem estar relacionados à prática do exercício físico durante a gestação em humanos como aborto espontâneo, hemorragia uterina, descolamento prematuro da placenta, trabalho de parto prematuro, hipertensão induzida pela gravidez, crescimento intrauterino retardado, sofrimento fetal, maior duração do trabalho de parto e maior tempo de recuperação pós-parto (Artal e O'Toole, 2003). Por outro lado, o exercício aeróbio regular pode melhorar ou manter o condicionamento físico e a imagem corporal durante a gravidez (Kramer e McDonald, 2006).

É relatado haver alterações no crescimento do feto e na placenta em mulheres ativas ou que iniciam um programa de exercício moderado para manutenção da massa corporal (Clapp *et al.*, 2002). O *Canadian guideline for physical activity throughout pregnancy*, recomenda a prática regular de exercício físico moderado na gestação (60%  $VO_{2máx}$ ) por 30 min, três vezes por semana, realizada na água de forma segura e eficiente (Mottola *et al.*, 2018).

Modelos experimentais têm sido utilizados para investigar os efeitos do exercício físico durante a gestação na saúde metabólica da prole adulta (Harris *et al.*, 2018). Vários tipos de roedores foram estudados com durações e modalidades variadas de treinamento físico. Nossos resultados prévios sugerem que o exercício materno (natação) antes e durante a gravidez melhora a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina na prole adulta (Tarevnic *et al.*, 2018), o que também é observado na atividade física espontânea onde se coloca uma “roda de exercício” na gaiola e os animais se mantêm ativos ao longo do tempo (Carter *et al.*, 2013; Laker *et al.*, 2014).

Um dos parâmetros a serem analisados na prescrição do exercício físico é a intensidade. Quando a atividade é submáxima pode levar a secreção inadequada de insulina. Assim, em um estudo experimental houve redução da ativação da insulina muscular e intolerância à glicose em filhotes adultos de ratas que treinaram corrida em esteira, cinco vezes semanais durante quatro semanas antes da gestação e mais 18 dias na gravidez (Quiclet *et al.*, 2016). Outros estudos experimentais com roedores mostraram que:

- a) mães ativas e sob restrição energética e proteica tendem a gerar machos mais resistentes à insulina em relação às fêmeas (Fernandez-Twinn *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2018);
- b) em comparação às sedentárias, as mães ativas originaram machos com superior metabolismo basal, melhor tolerância à glicose e sensibilidade da insulina (Harris *et al.*, 2018);
- c) em análogo confronto, as fêmeas apresentaram redução na glicemia de jejum e gordura corporal;
- d) em mães sedentárias, o impacto do treinamento sob o ganho de massa corporal pela prole é maior se a adesão ocorre antes da gravidez e na segunda metade da gestação com intensidade moderada;
- e) há carência de informações sobre o risco cardiometabólico da prole na idade adulta (Guillemette *et al.*, 2018).

Alguns estudos compararam os modelos experimental e humano no exercício físico materno durante a gravidez, demonstrando efeitos positivos a curto e longo prazos em mães e descendentes de roedores e humanos. Entre os achados foi constatado, o efeito protetor do exercício materno quando os animais são

alimentados com dieta hiperlipídica no ganho de massa corporal e nos níveis normalmente mais elevados de insulina e leptina (Ferrari *et al.*, 2018).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Gerais**

Avaliar o impacto de exercício físico materno (natação) no metabolismo e massa corporal da prole quando o pai é obeso.

### **2.2 Específicos**

- a. Estudar a variação da massa corporal dos progenitores e da prole;
- b. Avaliar a adiposidade dos progenitores e da prole;
- c. Medir a ingestão energética dos progenitores e da prole;
- d. Investigar a glicemia e a tolerância à glicose dos progenitores e da prole;
- e. Mensurar as variações dos lipídeos plasmáticos dos progenitores e da prole;
- f. Mensurar o conteúdo hepático de triacilglicerol e colesterol dos progenitores e da prole;
- g. Avaliar o metabolismo hepático da prole na idade adulta: quantificação da esteatose e de marcadores moleculares de lipogênese, beta-oxidação e inflamação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

O estudo utilizou camundongos machos e fêmeas C57BL/6, inicialmente com idade de quatro semanas, mantidos em estantes ventiladas com fluxo de ar unidirecional e constante (Nexgen system, Allentown Inc., PA, EUA) em condições controladas de temperatura ( $21\pm 2$  °C) e umidade ( $57\pm 10\%$ ).

Os animais foram submetidos a ciclo invertido de 12 h / 12 h claro-escuro e tiveram livre acesso à comida e água. Os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas para a experimentação com animais (Publicação NIH Nº. 85-23, revisada em 1996). O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG, CEUANº 003/2018).

Com 12 semanas de idade, os machos foram divididos aleatoriamente em dois grupos nutricionais ( $n = 20/\text{grupo}$ ) e alimentados com dieta hiperlipídica (grupo obeso-pai, **ObP**) ou dieta controle (grupo controle-pai, **CP**). As fêmeas receberam dieta controle e foram divididas nos grupos ( $n = 20/\text{grupo}$ ): treinado (grupo treinado-mãe, **TM**) e não treinado (grupo não treinado-mãe, **NTM**).

Um macho e uma fêmea de cada grupo foram colocados juntos para acasalamento. A cópula foi confirmada pela presença de um tampão vaginal, considerado o primeiro dia de gestação. Assim, foram obtidos quatro grupos de progenitores, de acordo com as diferentes combinações de dieta e exercício físico (Figura 4):

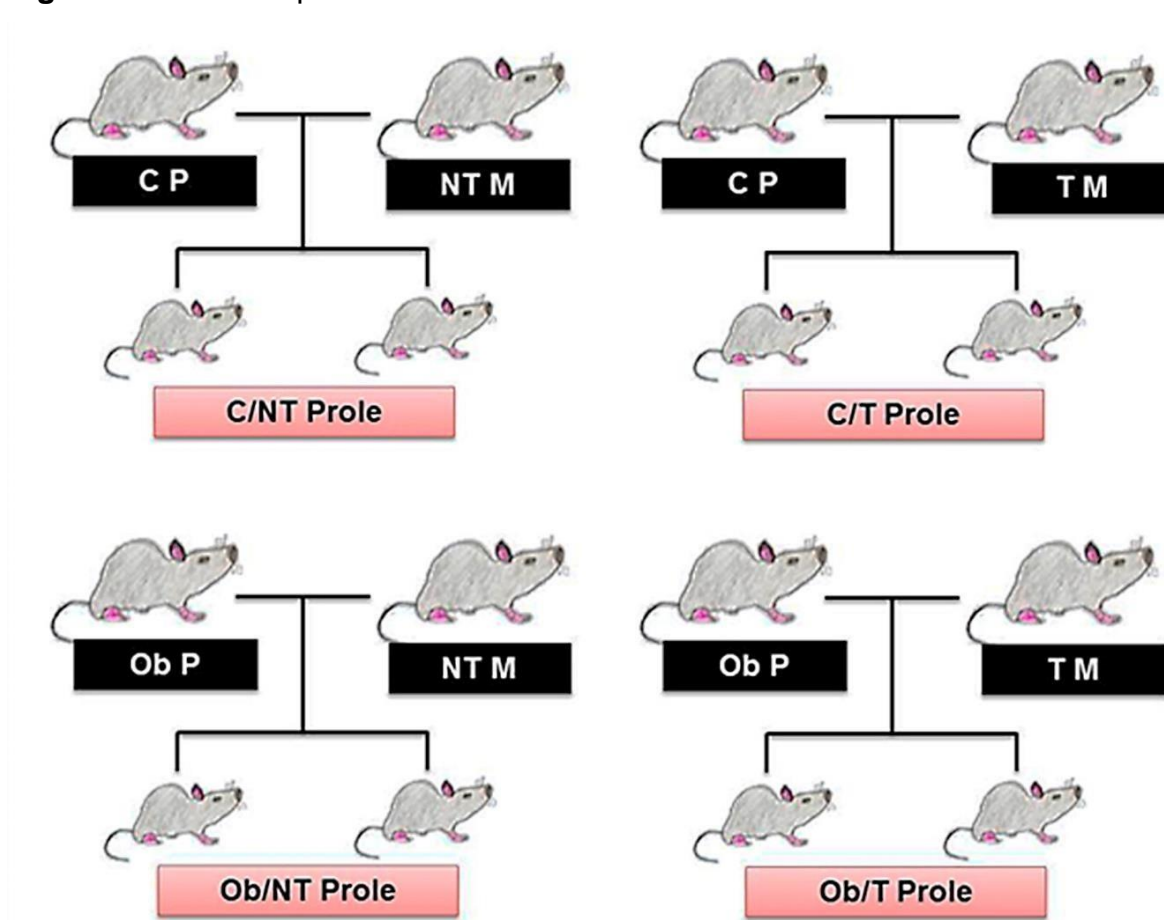
- a) CP/NTM,
- b) CP/TM,
- c) ObP/NTM,
- d) ObP/TM.

As ninhadas foram padronizadas contendo seis filhotes (três/machos e três/fêmeas, quando possível) e permaneceram com a mãe até o desmame. Após o desmame, um macho e uma fêmea de cada ninhada foram pegos aleatoriamente para formar os grupos experimentais.

Os filhotes foram identificados pelo sexo, dieta do pai (primeira sigla) e exercício da mãe (segunda sigla). Os progenitores foram sacrificados após o desmame da prole.

As dietas foram formuladas com ingredientes purificados. O conteúdo de vitaminas e minerais seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (Reeves *et al.*, 1993). Resumidamente temos que a dieta hiperlipídica foi composta 32% em kJ de carboidratos, 19% em kJ de proteína, e 49% em kJ de lipídeos, perfazendo 20,70 kJ/g. A dieta controle foi composta 64% em kJ de carboidratos, 19% em kJ de proteína, e 17% em kJ de lipídeos, perfazendo 16,50 kJ/g (Tabela 1). As dietas foram produzidas por encomenda pela empresa PragSoluções (Jaú, SP, Brasil).

**Figura 4:** Desenho experimental



Esquema da formação dos grupos experimentais. Os retângulos pretos representam os progenitores e os retângulos rosas indicam as proles. Abreviaturas: Ob: obeso por dieta, C: controle, NT: Mãe não treinada, T: Mãe treinada. Mãe NT cruzou com pai C e nasceram os filhotes C/NT fêmeas e machos; Mãe T cruzou com pai C e nasceram os filhotes C/T fêmeas e machos; Mãe NT cruzou com pai Ob e nasceram os filhotes Ob/NT fêmeas e machos; Mãe T cruzou com pai Ob e nasceram os filhotes Ob/T fêmeas e machos.

Os progenitores receberam suas respectivas dietas desde o período de pré-acasalamento até o desmame das proles. Os filhotes <sup>HL</sup> só receberam dieta controle (desde o desmame até os três meses de idade) (Figura 4).

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais (controle, C; hiperlipídica, HF) de acordo com as recomendações da American Institute of Nutrition (AIN93M) (Reeves et al., *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951).

<b>Ingredientes (g/Kg)</b>	<b>C</b>	<b>HF</b>
Caseína	190,00	230,00
Maisena	539.486	299.472
Sacarose	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	70,00
Banha de porco	-	200,00
Fibra	50,00	50,00
Mistura de vitaminas (mg)	10,00	10,00
Mistura de minerais (mg)	35,00	35,00
Cistina	3,00	3,00
Colina	2,50	2,50
Antioxidantes	0,014	0,028
Total em gramas (g)	1,000.00	1,000.00
Energia (kJ/kg)	16,590.00	20,790.00
Carboidratos(%Energia)	64	32
Proteína (%Energia)	19	19
Lipídeo (%Energia)	17	49

### 3.2 Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos progenitores e filhotes foi mensurada semanalmente. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente (às 12 h), como a

diferença entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa. As dietas experimentais foram renovadas diariamente, descartando a ração não ingerida. A ingestão energética diária foi obtida pelo produto da gramatura de ração ingerida e o valor energético da dieta em kJ.

### 3.3 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado nos progenitores dois dias antes do acasalamento, e nos filhotes ao completarem três meses de idade. Os animais ficaram em jejum durante seis horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril - 0,90% NaCl) na dosagem de 1 g/kg. Posteriormente, o sangue da veia caudal foi coletado nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min, e a área sob a curva (ASC) foi determinada (Prism v.8.2 para Windows, GraphPad, San Diego, CA, EUA). A leitura da glicose sanguínea foi realizada com glicômetro Accu-Chek active (Roche, SP, Brasil). Os valores de glicose no tempo zero foram considerados como a glicemia de jejum.

### 3.4 Protocolo de Exercício Físico (natação)

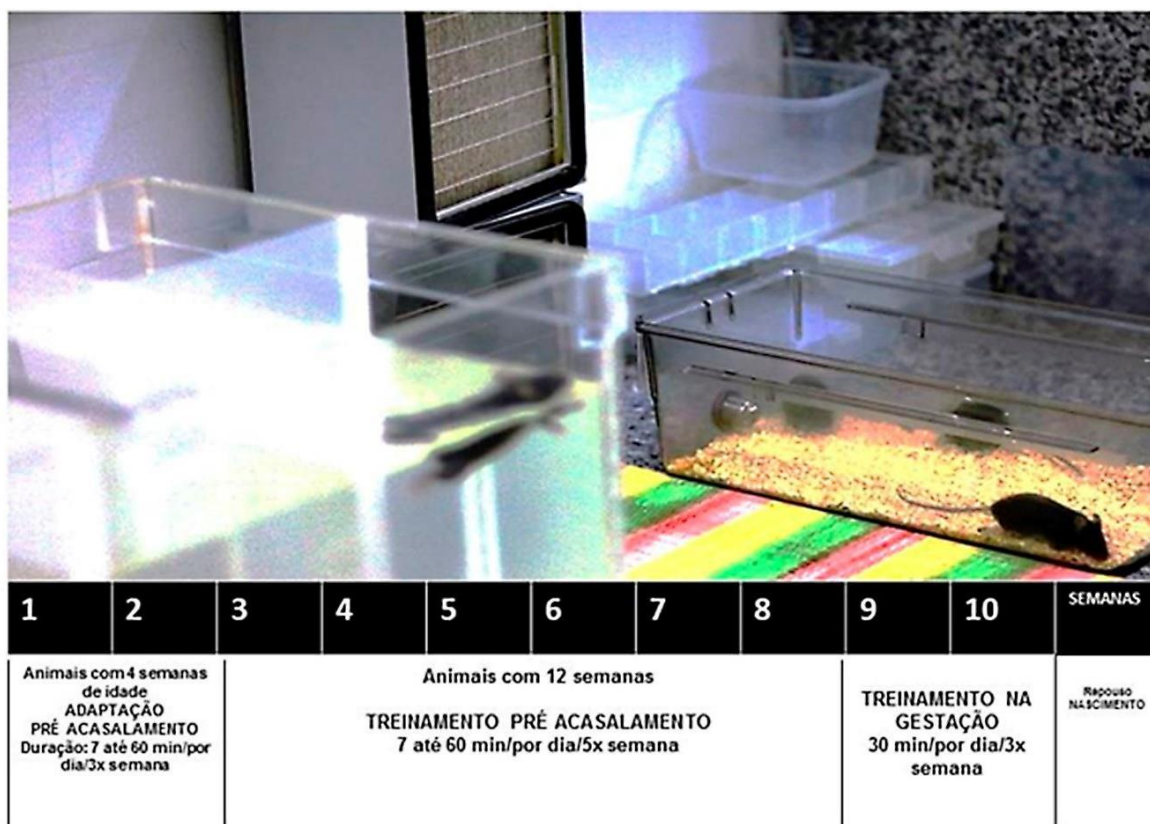
Camundongos fêmeas com quatro semanas de idade foram separados aleatoriamente em dois grupos conforme destinavam-se ao treinamento de natação ou não. O protocolo de treinamento consistiu em duas semanas de adaptação e oito semanas de treinamento, que iniciaram nas seis semanas antes do acasalamento e um período adicional de duas semanas durante a gestação):

- a) mães treinadas em natação (**TM**, n = 20),
- b) mães não treinadas (**NTM**, n = 20).

O protocolo de natação consistiu em duas semanas iniciais de adaptação com ajuste progressivo de tempo (sete minutos/dia até 60 min/dia, três vezes/semana). Em seguida as sessões passaram para cinco vezes/semana

durante seis semanas (Figura 5). Os animais nadavam livremente no espaço de natação e eram estimulados delicadamente a nadar quando necessário (quando estivessem flutuando), garantindo que os animais nadassem durante todo o experimento.

**Figura 5:** Esquema do protocolo de natação



Esquema do protocolo de natação experimental usado no estudo.

Um tanque de natação foi planejado, medindo 90 x 30 x 30 cm, dividido em 12 baias (15 x 15 cm por baia, Figura 5). A temperatura da água foi de 30-32 °C com um aquecedor elétrico portátil para água (mergulhão) com termostato de controle (Devco, Tulsa, OK, EUA). As mães foram treinadas na água durante duas semanas no período gestacional, três dias/semana por 30 min/dia. O protocolo de treinamento (Figura 5) correspondeu à 40-60% do  $VO_{2máx}$ , considerando o animal sedentário, configurando modo de intensidade baixa à moderada de longa duração.

### 3.5 Eutanásia, glicemia de jejum e insulina

Os animais da prole foram sacrificados com 12 semanas de idade após terem sido submetidos a jejum de seis horas e anestesiados (pentobarbital de sódio, 150 mg/kg intraperitoneal).

O sangue foi obtido por exsanguinação (vasos cervicais). A glicemia foi aferida (glicômetro Accu-Chek active, Roche, Alemanha), em seguida o sangue foi centrifugado para separar o plasma (1200 gpor 15 min).

A concentração de insulina foi determinada pelo kit ELISA para camundongo (Cat# EZRMI-13K, Millipore, MI, EUA, coeficiente de variação intra-ensaio 0,92 a 8,35% e coeficiente de variação inter-ensaio de 6,03 a 17,90%). Usou-se a termoplaca TP- READER para ler ELISA (BioTek Instruments, Inc., Highland Park, Los Angeles, CA, EUA). A sensibilidade à insulina foi avaliada com o índice quantitativo de verificação:

$$QUICKi = 1 / [\log (I0) + \log (G0)] \quad (1)$$

Onde: sendo I0 é insulina em jejum ( $\mu$ U/mL) e G0 é glicose em jejum (mg/dL).

O fígado foi rapidamente removido, pesado e alguns fragmentos de todos os lobos hepáticos foram amostrados aleatoriamente e congelados a  $-80$  °C para posterior análise molecular. Outros fragmentos foram fixados em solução fixadora (formaldeído à 4% m/v, 0,1 M, pH 7,2) por 48 h, que foram após incluídos em Paraplast Plus para análise em microscopia de luz (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

A gordura intra-abdominal presente na porção inferior do abdome, conectada aos ovários e tubas uterinas e epidídimos (dependendo do sexo do animal), foi considerada como sendo a gordura genital ovariana ou epididimária. O tecido adiposo subcuâneo localizado entre a parte inferior da caixa torácica e a raiz da coxa foi considerado como sendo a gordura inguinal. A gordura conectada à parede abdominal posterior, ao redor dos rins e à porção abdominal dos ureteres, foi tida como gordura retroperitoneal. O índice de adiposidade foi calculado pela divisão da

soma das massas das gorduras (genital, inguinal e retroperitoneal) pela massa corporal (apresentado em %) (Pawlak *et al.*, 2004).

### 3.6 Fígado

Os blocos de fígado incluídos em Paraplast Plus foram seccionados com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para análise em microscopia de luz (microscópio Nikon mod. 80i e câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., NY, EUA).

Usou-se estereologia para estimar a densidade de volume da esteatose hepática por meio da contagem de pontos (Aguila *et al.*, 2003; Mandarim-de-Lacerda, 2003). O  $V_v$  [esteatose, fígado] foi avaliado através de um sistema teste com número conhecido de pontos teste (PT):

$$V_v [\text{esteatose, fígado}] = P_P [\text{esteatose}] / P_T \quad (2)$$

Onde: PP é o número de pontos que atingem gotículas de gordura dos hepatócitos.

Esse método é validado para o estudo da esteatose hepática (Catta-Preta *et al.*, 2011). Para mensurar o TAG hepático, 50 mg do fígado congelado foram colocados no processador ultrassônico com 1 mL de isopropanol. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g e foram retirados 5 µL do sobrenadante e analisados em espectrofotômetro (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### 3.7 qPCR

A expressão do RNAm no fígado foi aferida por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (qPCR). O RNA total do fígado foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (12000 g, durante 10

min, 4 °C) e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. A essa porção foram adicionados 500 µL de isopropanol que reagiu por 10 min para que o RNA precipitasse e logo após a centrifugação foi repetida.

O isopropanol foi retirado, o *pellet* formado foi ressuscitado com 500 µL de etanol à 75%, depois centrifugado (12000 g, 5 min, 4 °C). O etanol foi retirado e o *pellet* foi ressuscitado em 20 µL de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas ao banho seco (50 °C por 5 min) e quantificadas no equipamento Nanovue (GE Life Sciences, EUA). O produto, já quantificado, foi diluído na proporção 1:100 em água MilliQ.

Para transcrição do RNA em DNA complementar (DNAc), 1,0 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA), e a primeira cadeia de DNAc foi sintetizada utilizando os iniciadores oligo (dT) para RNAm e o kit SuperScript III (Invitrogen, CA, EUA). O qPCR foi realizado utilizando termociclador BioRad CFX96 e mix SYBRGreen (Invitrogen, CA, EUA). As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (95 °C, 4 min), depois 44 ciclos, cada um a 95 °C por 10 s, e 60 °C por 15 s. A especificidade da amplificação foi determinada por meio de curvas de fusão (60 a 95 °C, com uma taxa de aquecimento de 0,1 °C/s).

A expressão gênica da beta-actina foi realizada em todas as amostras, sendo então utilizada como controle endógeno para normalização do RNAm. Os sinais foram quantificados utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  para estimar a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e do controle endógeno. Os iniciadores (*primers*) para PCR estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Primers.

Gene	Primers	
	FW	RW
Cpt 1	3'-AAGGAATGCAGGTCCACATC-5'	5'-CCAGGCTACAGTGGGACTT-3'
Faz	3'-CATCCAGATAGGCCTCATAGAC-5'	5'-CACCCACTGGAAGCTGGTAT-3'    1β
	3'-CTCACAAGCAGAGCACAAGC-5'	5'-CTCACAAGCAGAGCACAAGC-3'    6
	3'-ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT-5'	5'-ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT-3'
Ppar γ	3'-CATCGAGGACATCCAAGACA-5'	5'-CATCGAGGACATCCAAGACA-3'

Continuação

Gene	Primers	
	FW	RW
Srebp 1c	3'-TCTGCCTTGATGAAGTGTGG-5'	5'-TCTGCCTTGATGAAGTGTGG-3'
$\beta$ -actina	3'-TGAGACCTTCAACACCCCAGCCA-5'	5'-CGTAGTGGGCACAGTGTGGGTG-3'

Abreviações: Carnitina-palmitoiltransferase (Cpt 1); Ácido graxo sintase Fas; Interleucina (Il) 1 $\beta$ , Interleucina (Il) 6; Receptor ativado por proliferador de peroxissoma (Ppar)  $\gamma$ ; factor de transcrição da ligação do elemento regulador de Sterol (Srebp) 1c;  $\beta$ -actina,

### 3.8 Western Blotting

As proteínas do fígado foram extraídas com auxílio de tampão de lise (RIPA e HEPES) e inibidores de protease. Posteriormente, o homogenado obtido foi centrifugado duas vezes durante 10 min à 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, a concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de proteína BCA kit (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EUA). Após desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado ou 5% de albumina sérica bovina (BSA), ambos diluídos em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl]) em temperatura ambiente, durante duas horas para evitar ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada por aproximadamente 12 h à 4°C com os seguintes anticorpos primários:

- a)  $\beta$ -Actina (43 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-130300);
- b) interleucina (IL) 1 $\beta$  (17 kDa; Santa Cruz, sc-52012);
- c) IL6 (26 kDa; Abcam, AB-7737);
- d) receptor C ativado por proliferador de peroxissoma, PPAR $\alpha$  (55k Da; Santa Cruz Biotechnology, sc-9000);
- e) receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma, PPAR $\gamma$  (67 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-773);
- f) supressor da sinalização de citoquina 3 (SOCS3) (30 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-7009);
- g) fator nuclear kappa (NFk) B (65 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-

- 8008);
- h) proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) 1c (68 kDa; SantaCruz Biotechnology, sc-367);
  - i) fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) (26 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-1350).

Depois de incubada com anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico, durante uma hora em temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas quimiluminescentes foi quantificada utilizando o programa ImageJ (v.1.51, NIH, [imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij), EUA). O complexo de ligação do anticorpo foi desfeito e a membrana foi remarcada com beta-actina como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos pelo *Western blotting*.

### 3.9 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). Foram analisados separadamente em machos e em fêmeas (análise de variância, ANOVA, de Brown- Forsythe e Welch, indicada quando a violação da homogeneidade da variância dos grupos não pode ser determinada), e teste de comparações múltiplas de Dunnett T3 (recomendado para amostras pequenas) (Dunnett, 1980).

As diferenças entre machos e fêmeas foram estimadas pelo teste *t-Student* não pareado, com correção de Welch. O valor  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (Prism, v. 8.2 para Windows, GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dados dos progenitores

#### Efeito da dieta hiperlipídica nos pais e da natação nas mães

##### a) Pais

A dieta rica em gordura consumida pelos pais teve como consequência uma maior ingestão de energia (+20%) e maior massa corporal nos grupos ObP em comparação ao grupo CP. Além disso, os níveis plasmáticos de glicose em jejum e TOTG ( $P < 0,001$ , +40%), TC ( $P = 0,008$ , +38%) e TAG ( $P < 0,001$ , +55%) foram maiores no grupo ObP do que no grupo CP (Tabela 3). A diferença na massa corporal final foi de 18% ( $P < 0,001$ ) comparando os pais controles com os pais obesos. A adiposidade corporal nos pais variou de 0,92% nos pais controles e 1,40% nos pais obesos ( $P = 0,02$ ) no final das oito semanas.

##### b) Mães

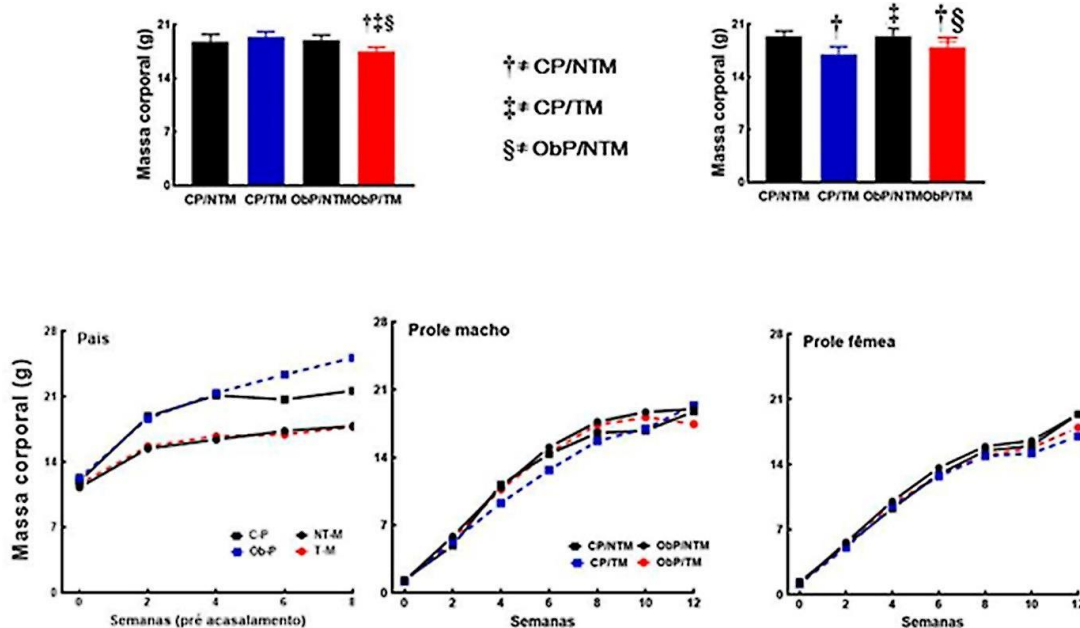
O TOTG nas mães foi menor no grupo TM em comparação ao grupo NTM ( $P = 0,013$ , - 18%). A massa corporal das mães treinadas e não treinadas comparando o início ao final do experimento foi semelhante (pouco mais de 50%). No entanto, a mãe treinada apresentou menor adiposidade corporal do que a mãe não treinada (-67%,  $P = 0,01$ ).

**Tabela 3. Bioquímica, massa corporal e adiposidade dos pais.** Grupos: C = controle; Ob = obeso; T = treinada; NT= não treinada. Os dados são mostrados em média±DP; teste de Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste seguido de post hoc teste de Dunnet T3.  $P < 0,05$  quando: \*≠C-P; \*\*≠ NTM.

Progenitores	Pai		Mãe	
	C	Ob	NT	T
IE (kJ/animal/dia)	34.3±2.11	41.0±1.92*	28.7±2.01	28.5±1.74
GJ (mmol/L)	5.9±1.39	8.2±2.21*	5.6±0.31	6.7±0.69
IA (g/animal/dia)	2.1±0.36	2.0±0.37	1.7±0.47	1.7±0.47
TOTG (mmol/L/min)	806.9±127.4	1133.0±120.4*	961.1±60.2	788.1±56.8**
CT (mg/dL)	61.0±13.66	84.4±7.26*	67.1±4.36	71.9±5.96
TG (mg/dL)	33.3±4.4	51.8±6.67*	30.2±5.32	30.3±2.87
Massa corporal inicial - MC(g)	12,14±1,47	13,18±1,59	11,45±1,19	12,01±1,16
Masa corporal final- MC(g)	21,70±1,04	25,6±1,55*	17,97±1,42	18,36±1,44
Índice de adiposidade (%)	0,92±0,04	1,40±0,25 <sup>†</sup>	1,52±0,47	0,50±0,17 <sup>**</sup>

**Abreviações:** IA (ingestão alimentar), IE (ingestão energética), GJ (glicemia de jejum), TOTG (teste de tolerância oral a glicose), CT (colesterol total), TG (triglicerídeos).

**Figura 6:**



Evolução da massa corporal dos animais. Média e SD (análise de variância e teste post-hoc de Holm-Sidak). C, dieta controle; Pai; Ob, dieta rica em gordura; Mãe; NT, não treinada; T, treinada.

## 4.2 Dados na prole

O número de filhotes nascidos vivos e natimortos não foi significativamente diferente comparando a mãe NT e mãe T ( $\chi^2 = 0,852$ ,  $P = 0,356$ ).

As proles de machos e fêmeas foram consideradas separadamente, testando as possibilidades referentes do acasalamento de pais e mães (pais controle - CP, ou pais obesos - ObP, com mães não treinadas - NTM ou mães treinadas - TM):

- a) CP/NTM vs. CP/TM;
- b) CP/NTM vs. ObP/NTM;
- c) CP/TM vs. ObP/TM;
- d) ObP/NTM vs. ObP/TM.

### a) Massa corporal e gordura corporal

A massa corporal não foi significativamente diferente entre os grupos de machos e os grupos de fêmeas. A massa gordurosa genital foi mais pesada no grupo ObP/NTM do que no grupo CP/NTM (macho, +100%; fêmea, +110%), mais leve na prole ObP/TM do que na prole ObP/NTM (macho, -27%; fêmea, -48%) (Tabela 4).

**Tabela 4. Biometria e bioquímica** (C= pai controle, Ob= pai obeso, NT=mãe não treinada e T=mãe treinada). Média  $\pm$  DP, ANOVA de Brown-Forsythe e Welch seguido de teste de Dunnett T3.  $P < 0.05$  quando: \* $\neq$ C pai; \*\* $\neq$ NT mãe.

PROLE MACHO	CP/NTM	CP/TM	ObP/NTM	ObP/TM
Colesterol Total (mg/dL)	1,37 $\pm$ 0,46	2,06 $\pm$ 0,44	3,10 $\pm$ 0,06†	1,75 $\pm$ 0,52§
Gordura genital (g)	0,13 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,04†	0,19 $\pm$ 0,04§
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	1,98 $\pm$ 0,39	1,88 $\pm$ 0,44	1,98 $\pm$ 0,22	1,99 $\pm$ 0,56
Ingestão energética(kJ/dia/animal)	32,84 $\pm$ 2,56	31,19 $\pm$ 1,99	32,84 $\pm$ 2,09	33,01 $\pm$ 2,61
Massa corporal (12 semanas, g)	18,75 $\pm$ 0,97	18,97 $\pm$ 1,33	22,1 $\pm$ 0,60	17,45 $\pm$ 0,60
Massa corporal (desmame, g)	6,10 $\pm$ 1,08	6,35 $\pm$ 0,89	7,20 $\pm$ 0,79	7,03 $\pm$ 1,38
Massa corporal (nascimento, g)	1,33 $\pm$ 0,16	1,19 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,14	1,19 $\pm$ 0,11
TOTG (ASC, mmol/L/min)	777,3 $\pm$ 40,1	765,7 $\pm$ 33,8	938,1 $\pm$ 26,8†	725,1 $\pm$ 35,3§
Triacilglicerol (mg/dL)	0,61 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,09†	0,71 $\pm$ 0,06§

Continuação

PROLE FÊMEA	CP/NTM	CP/TM	ObP/NTM	ObP/TM
Colesterol Total (mg/dL)	1,76±0,17	1,82±0,11	3,19±0,24†	1,85±0,22 <sup>§</sup>
Gordura genital (g)	0,10±0,04	0,08±0,04	0,21±0,03†	0,11±0,05 <sup>§</sup>
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	1,98±0,48	1,84±0,32	1,99±0,26	2,05±0,57
Ingestão energética (kJ/dia/animal)	32,84±2,42	30,53±2,09	33,01±2,22	34,01±1,99
Massa corporal (12 semanas, g)	19,38±0,67	17,17±1,31	19,41±1,61	17,95±0,74
Massa corporal (desmame g)	6,19±1,14	6,32±1,10	7,23±0,72	6,82±1,15
Massa corporal (nascimento, g)	1,39±0,15	1,13±0,11	1,16±0,12	1,24±0,10
TOTG (ASC, mmol/L/min)	747,3±28,5	744,4±26,3	917,4±22,2†‡	786,1±38,7 <sup>§</sup>
Triacilglicerol (mg/dL)	0,64±0,11	0,60±0,18	0,88±0,06†	0,69±0,15 <sup>§</sup>

## b) Glicemia e lipídeos plasmáticos

### Machos

A ingestão de alimentos e a ingestão de energia não foram diferentes na prole masculina. No entanto, a glicemia de jejum (+27%), TOTG (+20%), TC (+125%) e TAG (+50%) foram aumentados nos grupos ObP/NTM vs. CP/NTM. A glicemia de jejum permaneceu maior em ObP/NTM vs. CP/TM (+30%). TOTG, TC e TAG apresentaram baixos níveis nos grupos ObP/TM vs. ObP/NTM (Tabela 4).

### Fêmeas

A ingestão de alimentos e a ingestão de energia não foram diferentes na prole feminina. No entanto, a glicemia de jejum foi maior nos grupos ObP / NTM vs. CP / NTM (+ 18%), mas menor nos grupos ObP/TM vs. ObP/NTM (-17%). Além disso, TOTG (+23%), TC (+80%) e TAG (+38%) apresentaram níveis mais elevados em ObP/NTM comparado a CP/NTM, e menores níveis nos filhotes ObP/TM vs. ObP/NTM (TOTG, - 14%; TC, -40%; TAG, -22%) (Tabela 4)

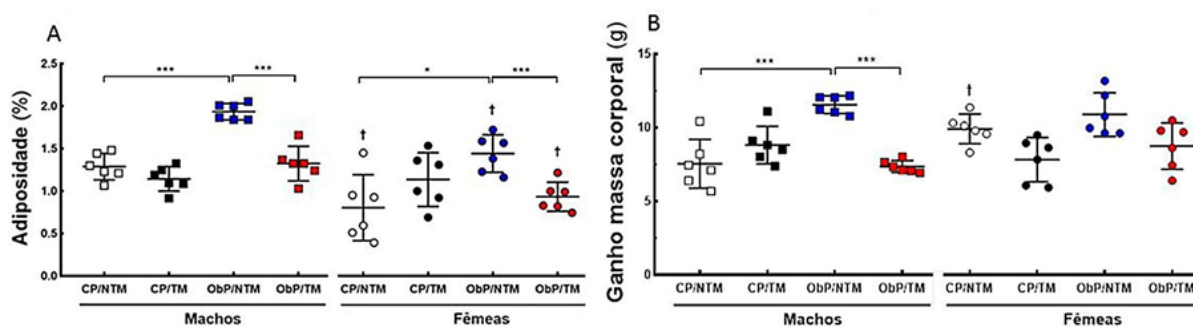
Vimos diferenças mais significativas comparando CP/NTM e ObP/NTM, estas ressaltam os efeitos da obesidade dos pais, enquanto a comparação

ObP/NTM e ObP/TM considera os efeitos do treinamento da mãe. Além disso, em alguns parâmetros analisados nos filhotes, houve dimorfismo sexual (indicado nas figuras com o sinal †).

As alterações na massa corporal foram observadas apenas nos filhotes machos, mas houve dimorfismo sexual entre os filhotes dos grupos CP/NTM (as fêmeas ficaram 24% mais pesadas que os machos). Houve um ganho nos filhotes ObP/NTM em comparação à prole CP/NTM (+53%), entretanto os filhotes ObP/TM apresentaram menor ganho de massa em comparação aos filhotes ObP/NTM (-35%) (Figura 7A).

A adiposidade corporal variou de forma semelhante ao ganho de MC nos machos, contudo as fêmeas também apresentaram mudança na gordura corporal semelhante ao que aconteceu nos machos. Os filhotes ObP/NTM tiveram maior adiposidade do que os filhotes CP/NTM e a adiposidade foi menor nos filhotes ObP/TM do que nos filhotes ObP/NTM. O único grupo que não apresentou dimorfismo sexual foram os filhotes do grupo CP/TM (Figura 7B).

**Figura 7:**



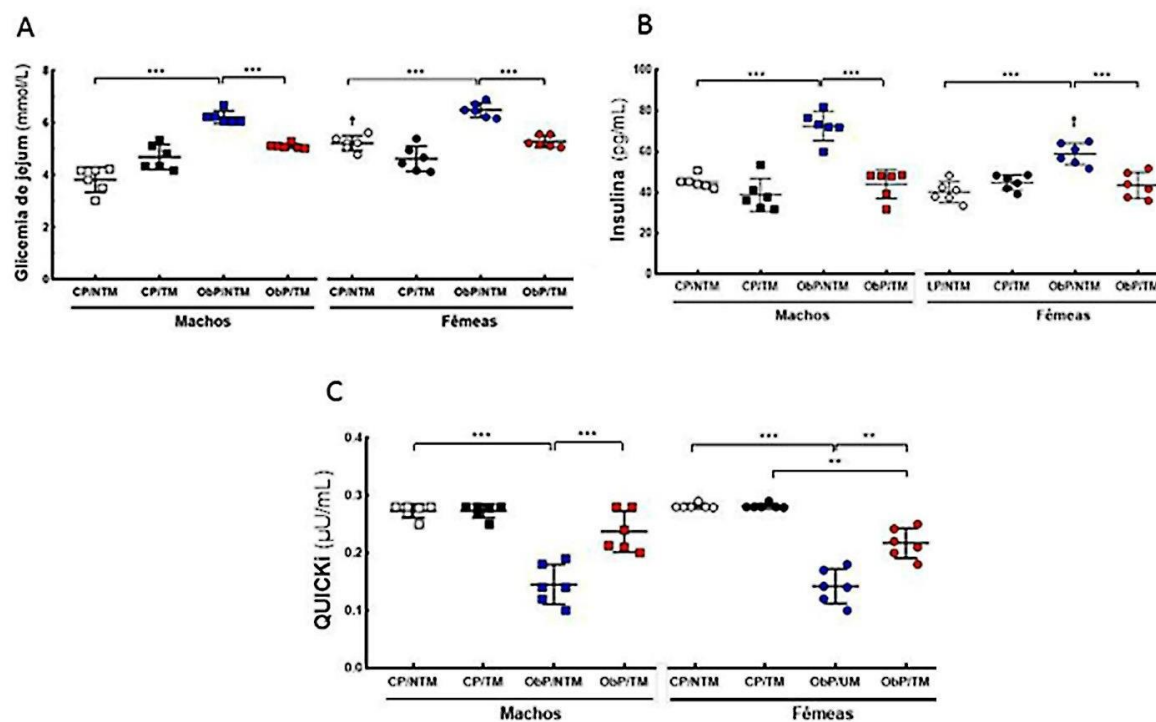
Dados da prole. (A) Ganho de massa corporal e (B) Adiposidade de filhotes machos e fêmeas com 12 semanas de idade. Os dados são apresentados como a média±DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnett T3. O dimorfismo sexual foi testado com o t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e †≠ dos respectivos machos. Abreviações: CP (pai controle), ObP(pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada).

A glicemia de jejum e os níveis plasmáticos de insulina mostraram variação parecida entre os grupos de filhotes. Os níveis de glicose e insulina foram maiores nos filhotes ObP/NTM e menores nos filhotes ObP/TM (Figuras 8A-B). A sensibilidade à insulina, medida pelo QUICKi, foi menor nos filhotes ObP/NTM em comparação com os filhotes CP/NTM (-47% nos machos, -50% nas fêmeas). Além

disso, o QUICKi na prole feminina foi menor no grupo ObP/TM quando comparada com o grupo CP/TM (-23%), o que demonstra o forte efeito da obesidade do pai neste caso (Figura 8C).

Tanto a massa hepática (Figura 9A) quanto o conteúdo de triacilgliceróis (Figura 9B) foram maiores nos filhotes do grupo ObP/NTM em comparação com o grupo CP/NTM (devido à obesidade do pai) e menores no grupo ObP/NTM em comparação com o grupo ObP/TM (devido ao treinamento da mãe). Além disso, a massa hepática e triacilgliceróis diminuíram nos filhotes, comparando os grupos CP/NTM e CP/TM (devido ao treinamento da mãe). No entanto, a massa hepática foi maior nos filhotes machos quando comparados os grupos CP/TM e ObP/TM (devido à obesidade do pai) (+18%). Deve-se notar que houve dimorfismo sexual na massa hepática na prole de todos os grupos e o do conteúdo de triacilgliceróis no grupo ObP/NTM.

**Figura 8:**



Dados da prole. (A) glicemia de jejum, (B) insulina e (C) o QUICKi dos filhotes machos e fêmeas com 12 semanas de idade. Os dados são apresentados como a média±DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnett T3. O dimorfismo sexual foi testado com o t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e †≠ dos respectivos machos. Abreviações: CP (pai conrole), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada).

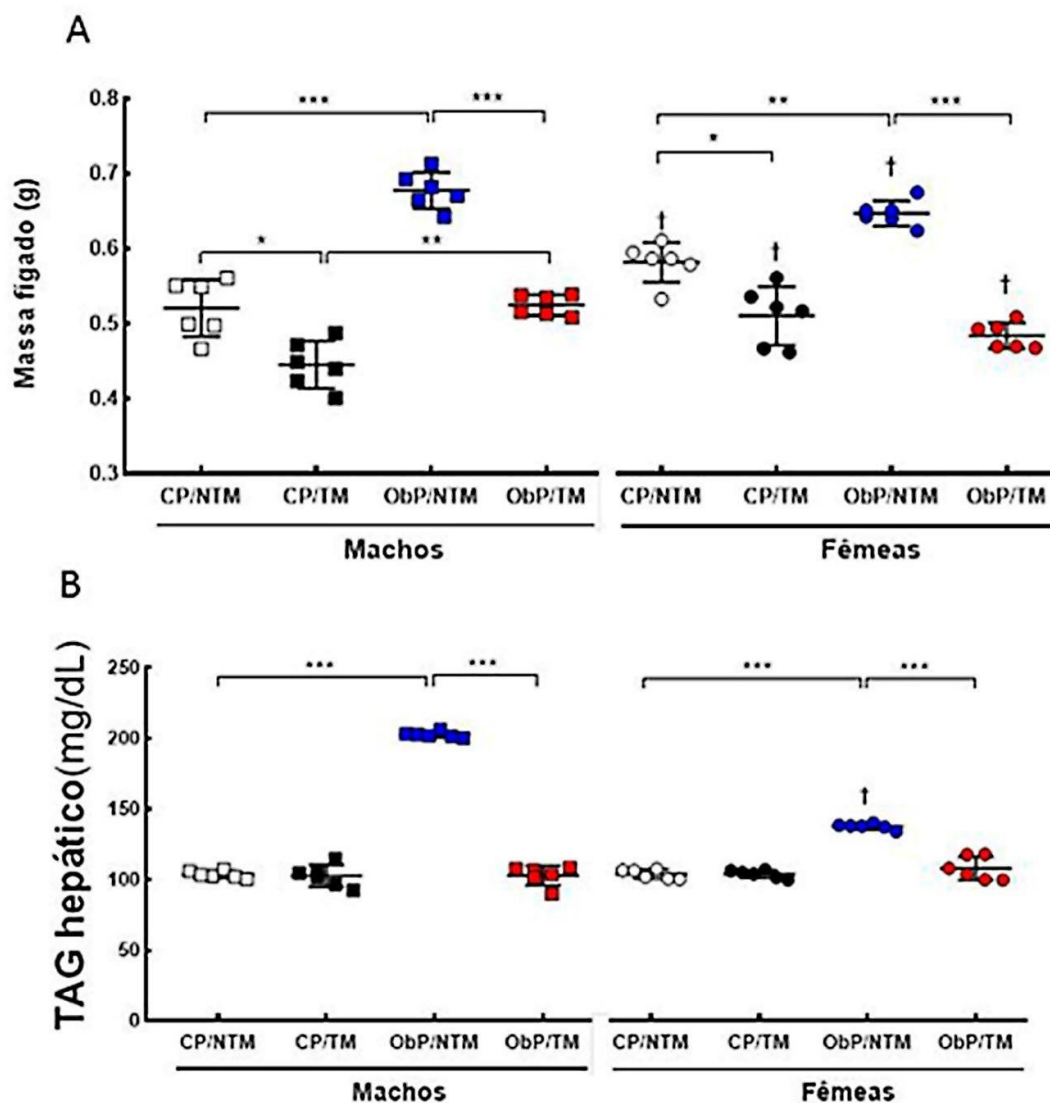
A presença de esteatose hepática foi observada principalmente nos filhotes dos grupos, nos quais os pais eram obesos (ObP) e quando a mãe era destreinada (NTM). Quando a mãe era treinada (TM), mesmo com o pai obeso, os filhotes apresentaram pouca esteatose hepática (Figura 10A - as fotomicrografias mostradas na figura são do fígado da prole masculina).

A quantificação da esteatose hepática por estereologia (Figura 10B) evidenciou grande aumento da esteatose nos filhotes ObP/NTM em comparação com os filhotes CP/NTM (machos +133%, fêmeas +145%). O treinamento da mãe reduziu significativamente a esteatose hepática nos filhotes dos pais obesos, ObP/NTM em comparação com os filhotes ObP/TM (machos -65%, fêmeas -47%). A esteatose hepática foi ainda 100% maior nos filhotes fêmeas da mãe que foi treinada, mas que o pai obeso: Como observado na comparação entre grupos CP/TM e ObP/TM, indicando que a obesidade do pai é um fator significativo na programação da esteatose hepática nas filhas. Vale ressaltar que houve dimorfismo sexual nos grupos em que a mãe foi treinada.

Um achado constante, independentemente do sexo dos filhotes, foi que as expressões marcadores de lipogênese hepática e beta-oxidação mostram que houve aumento da lipogênese e diminuição da beta-oxidação devido ao pai obeso (ObP/NTM em comparação com CP/NTM) e redução da lipogênese e aumento da beta-oxidação devido ao treinamento materno (ObP/TM em comparação com ObP/NTM) (Figuras 11A-C e 12A-D).

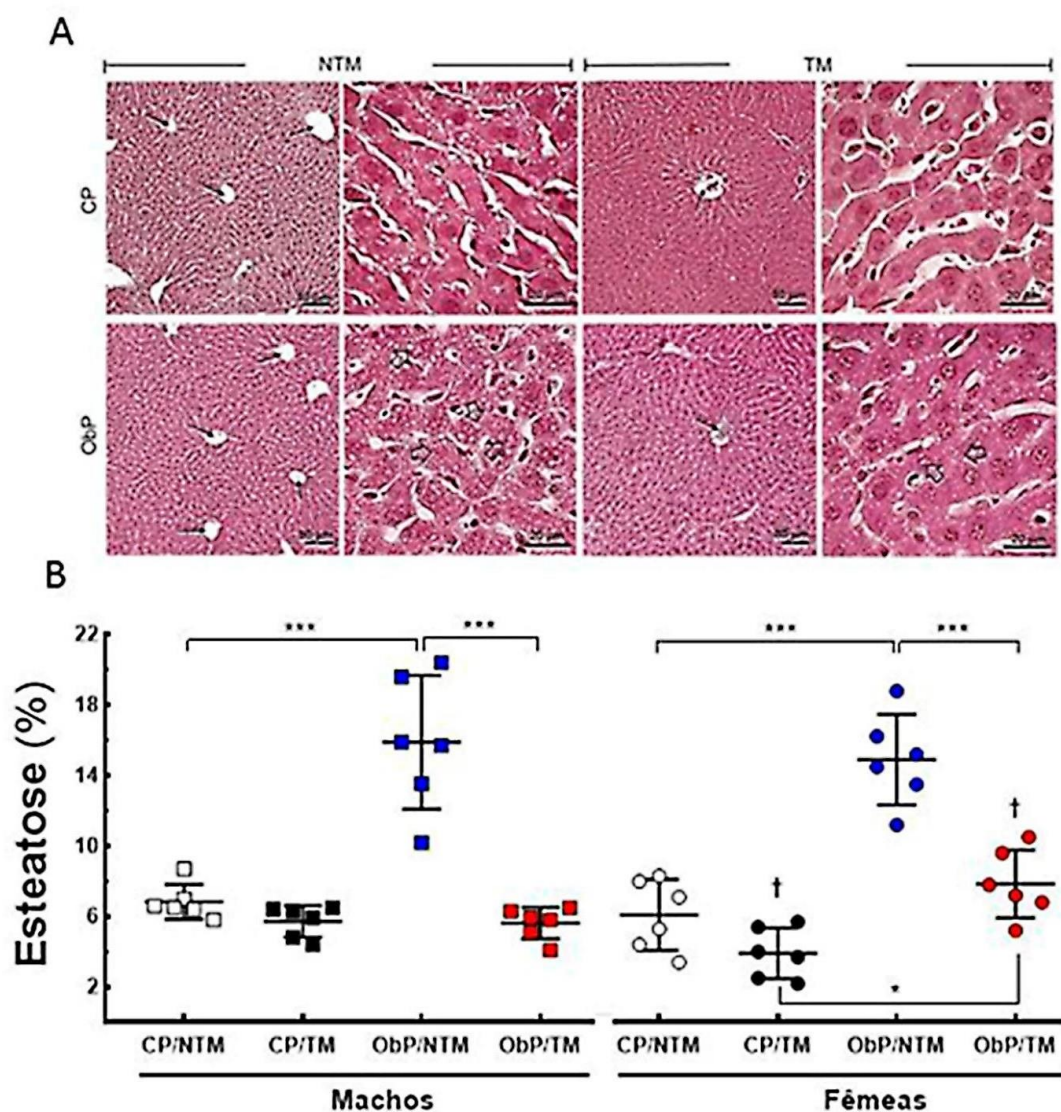
Com exceção da expressão da proteína PPAR $\alpha$  (Figura 11C) e gênica do Cpt1 (Figura 12D), que mostram o contrário, mas com o mesmo significado. A primeira apresentou diminuição nos machos ao comparar CP/NTM com CP/TM e CP/TM com ObP/TM, nesta o Cpt1 foi diminuído nos machos. Na expressão de proteínas, houve dimorfismo sexual nos valores do SREBP1 e do PPAR $\alpha$  e na expressão gênica do Ppar  $\gamma$ .

Figura 9



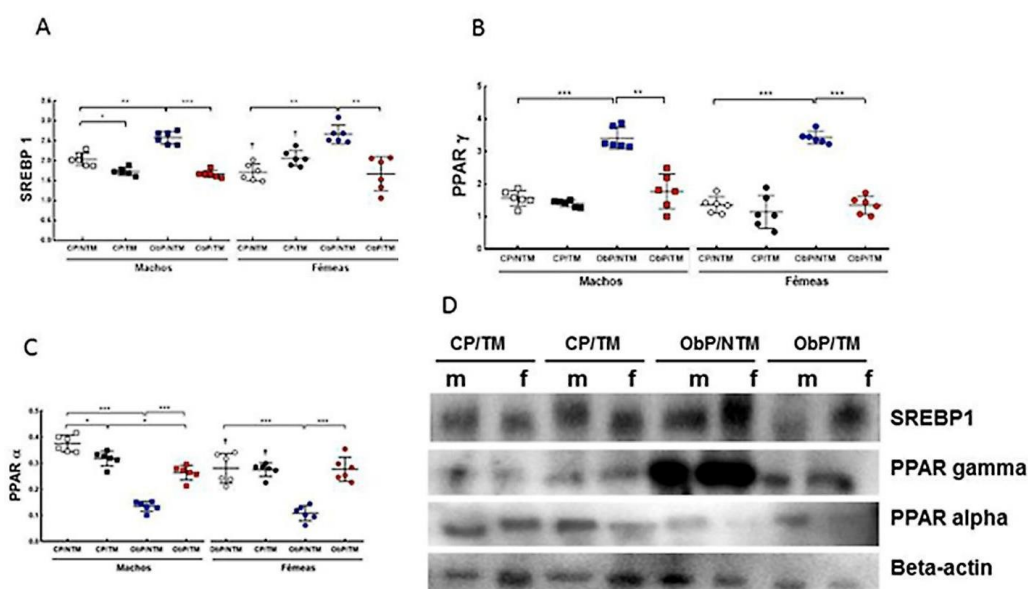
Dados da prole. (A) Massa hepática e (B) TAG hepático nos filhotes machos e fêmeas com 12 semanas de idade. Os dados são apresentados como a média±DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnett T3. O dimorfismo sexual foi testado com o teste t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*Valor- $P < 0,001$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e †≠ dos respectivos machos. Abreviaturas: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), TAG (triacilglicerol).

Figura 10



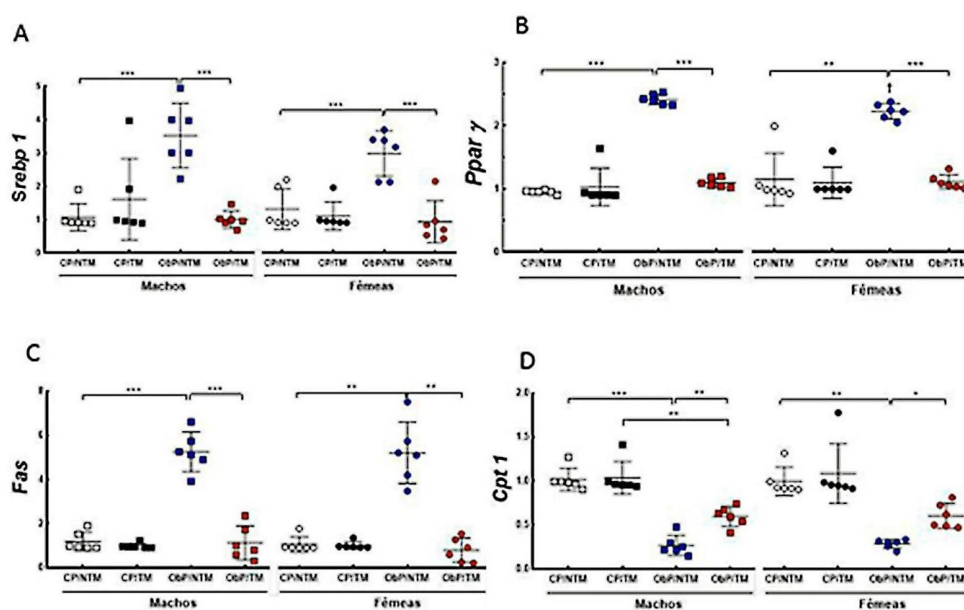
Dados da prole. (A) Fotomicrografias do fígado e (B) Densidades de volume (Vv) de esteatose dos filhotes machos e fêmeas com 12 semanas de idade. Os dados são apresentados como média±DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnet T3. O dimorfismo sexual foi testado com t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e †≠ dos respectivos machos. Abreviações: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada).

Figura 11



Expressões proteicas associadas à lipogênese e beta-oxidação no fígado da prole. A - Proteína de ligação ao elemento regulador do esterol 1; B - receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; C – Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; D bandas representativas de imunotransferência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnet T3: \*Valor- $P < 0,05$ ; \*\*Valor- $P < 0,01$ ; \*\*\*Valor- $P < 0,001$ ; teste t-Student com correção de Welch para comparação de machos e fêmeas em grupos similares ( $\dagger$  valor- $P < 0,05$ ). Abreviações: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), m (machos), f (fêmeas).

Figura 12



Dados da prole: expressão do gene no fígado. (A) Srebp1, (B) Ppar, (C) Fas, (D) Cpt1 dos filhotes macho e fêmeas com 12 semanas de idade. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnet T3. O dimorfismo sexual foi testado com t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*Valor- $P < 0,001$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e  $\dagger \neq$  dos respectivos machos. Abreviaturas: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), SREBP1 (proteína reguladora do elemento regulatório Sterol 1), PPAR $\gamma$  (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), FAS sintase), CPT-1 (carnitina palmitoiltransferase).

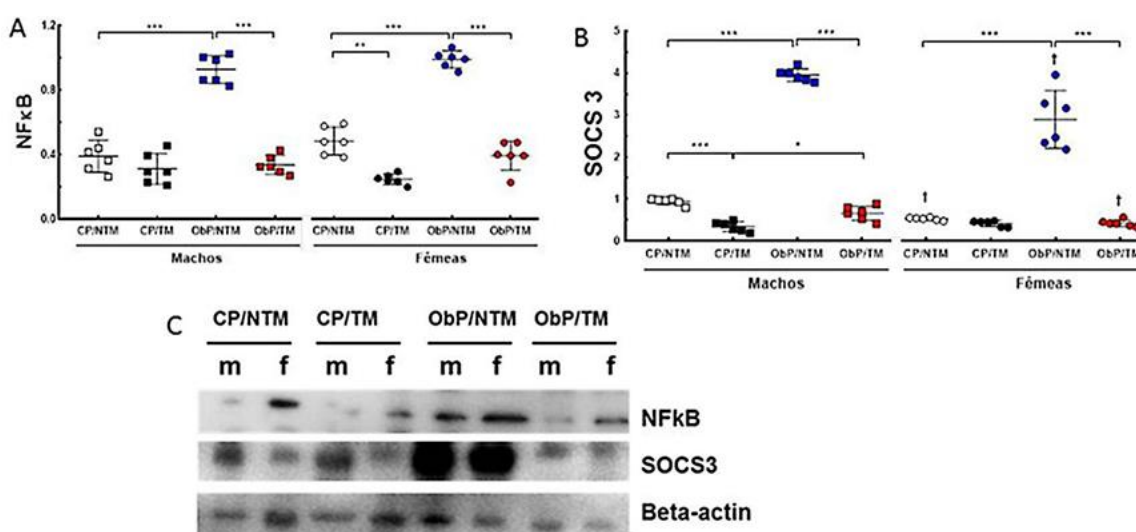
As expressões proteicas (Figuras 13 e 14) e expressões gênicas (Figura 15) possibilitaram a análise dos marcadores de inflamação hepática na prole, cujos resultados foram repetitivos e mostraram aumento nos filhotes ao comparar os grupos ObP/NTM e CP/NTM, e diminuição desses marcadores inflamatórios quando comparados os filhotes ObP/TM com ObP/NTM.

Além disso, houve redução na expressão proteica de NFκB nos filhotes fêmeas do grupo CP/TM em comparação com o grupo CP/NTM (Figura 13A). Na prole masculina, o grupo CP/TM apresentou menor expressão proteica do SOCS3 em comparação com

o grupo CP/NTM (-64%) e ObP/TM (-20%) (Figura 13B). A expressão proteica de IL6 nos filhotes machos foi 24% menor no grupo CP/TM em relação ao ObP/TM (Figura 14B). O dimorfismo sexual se mostrou presente na expressão proteica do SOCS3, TNFα e IL6 nos grupos CP/NT e ObP/TM; ObP/TM e CP/TM, respectivamente.

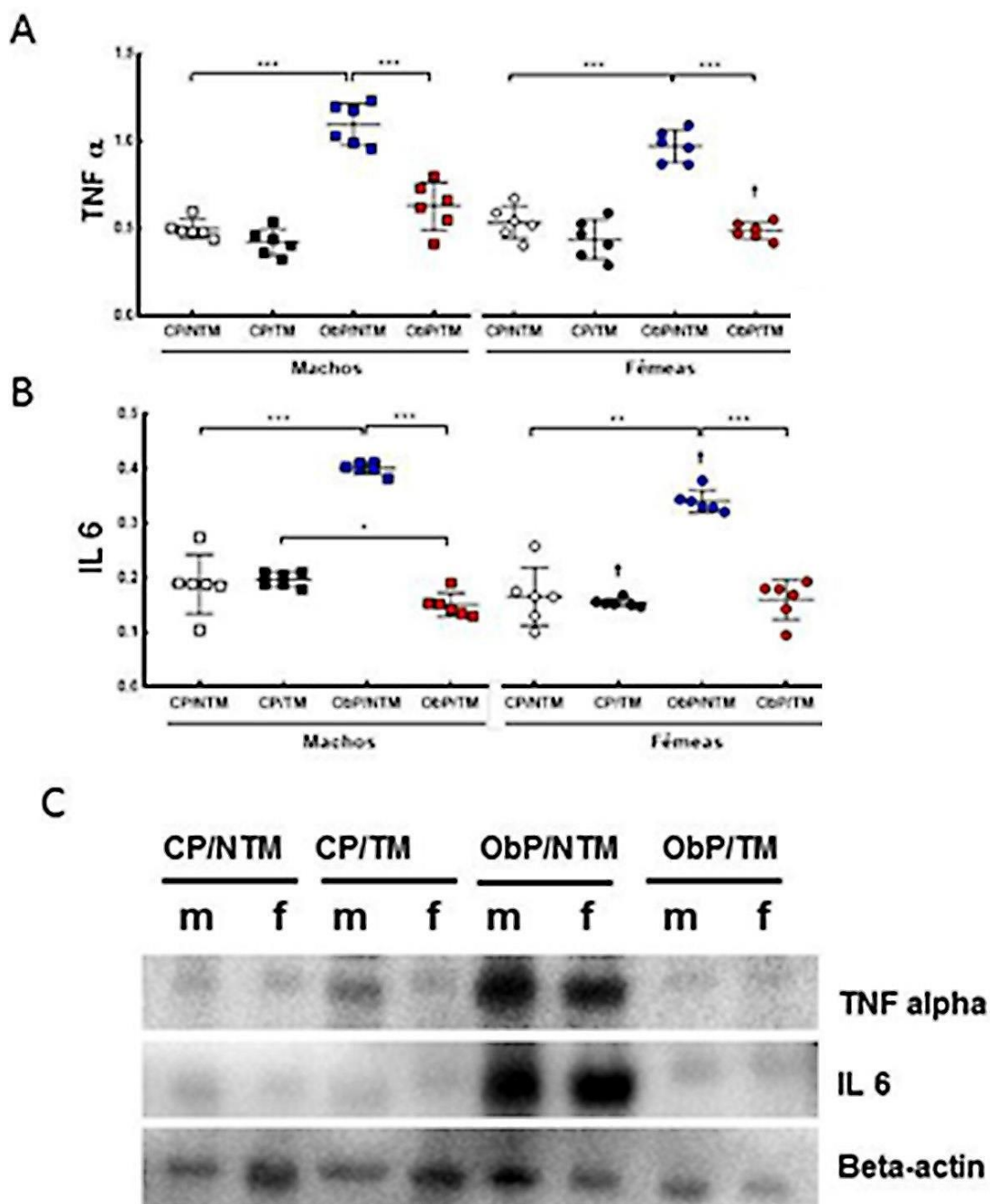
As expressões gênicas de Il1β e Il6 (Figuras 15A-B) nos filhotes de ambos os sexos do grupo ObP/NTM expressam esses marcadores significativamente maiores do que os outros grupos, entretanto, sem dimorfismo sexual aparente.

**Figura 13**



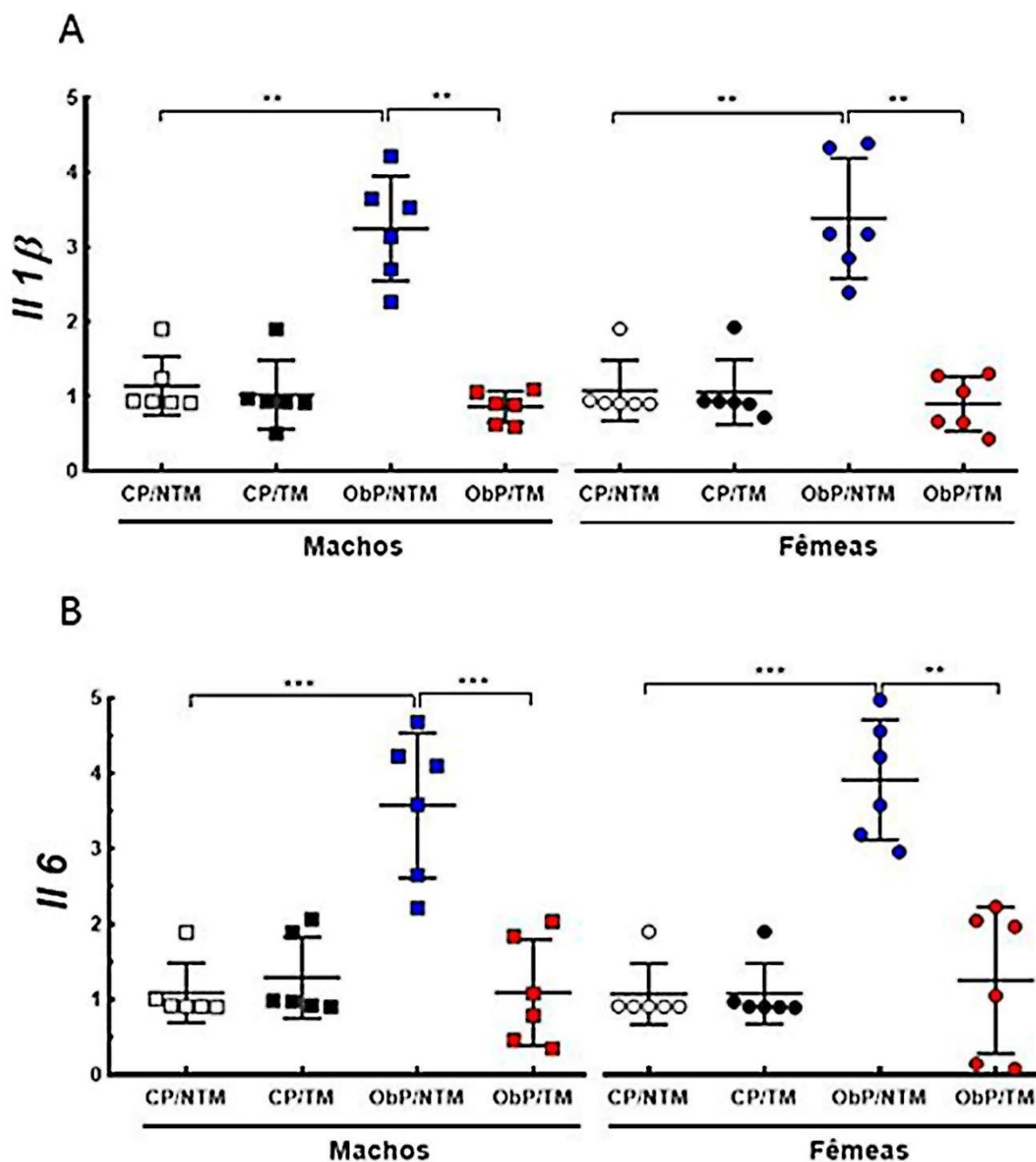
Expressão da proteína hepática de inflamação na prole. (A) NFκB (em unidades arbitrárias, a.u.), (B) SOCS3 (em unidades arbitrárias, a.u.), (C) bandas representativas de imunotransferência. Os dados são apresentados como a média±DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA com pós-teste Dunnett T3. O dimorfismo sexual foi testado com o teste t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*Valor- $P < 0,001$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e † ≠ males respectivos machos. Abreviaturas: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), m (machos), f (fêmeas) NFκB (fator nuclear kappa B), SOCS3 (supressor da sinalização de citocinas 3).

Figura 14



Expressão da proteína hepática de inflamação na prole. (A) TNF $\alpha$  (em unidades arbitrárias, a.u.), (B) IL6 (em unidades arbitrárias, a.u.) e (C) bandas representativas de imunotransferência. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnett T3. O dimorfismo sexual foi testado com o t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*Valor- $P < 0,05$ , \*\*Valor- $P < 0,001$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e † $\neq$  dos respectivos machos. Abreviaturas: Cpai (pai controle), Obpai (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), m (machos), f (fêmeas), TNF $\alpha$  (fator de necrose alfa), IL6 (interleucina 6).

Figura 15



Expressão do gene do fígado na inflamação da prole. (A)  $IL1\beta$ , (B)  $IL6$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ DP; Brown-Forsythe e Welch ANOVA teste, seguido pelo teste pós-teste Dunnett T3. Ao dimorfismo sexual foi aplicado o t-Student não pareado com correção de Welch. Significância estatística: \*\*Valor- $P < 0,001$ , \*\*\*Valor- $P < 0,0001$  e † $\neq$  dos respectivos machos. Abreviações: CP (pai controle), ObP (pai obeso), NTM (mãe não-treinada), TM (mãe treinada), IL (interleucina).

## 6 DISCUSSÃO

O estudo investigou, na prole, o efeito da natação da mãe quando o pai era obeso. A mãe nadadora pode atenuar os efeitos adversos da “programação pelo pai obeso”. Na prole adulta (alimentada apenas com a dieta controle desde o desmame) analisamos parâmetros biométricos e bioquímicos e análises moleculares no fígado para estudar a lipogênese, beta-oxidação e inflamação.

Os dados biométricos da prole foram afetados negativamente pela obesidade do pai, mas atenuados pela mãe nadadora. Além disso, cerca de 75% dos marcadores de lipogênese, beta-oxidação e inflamação do fígado da prole mostraram piora com a obesidade do pai, mas melhora quando a mãe praticou natação.

A “programação fetal” induzida pelo pai obeso (também denominada as origens paternas da transmissão de saúde e doença) são consideradas alterações no epigenoma (incluindo metilação do DNA, modificações na histona e transcrições de RNAs não codificantes) (Soubry *et al.*, 2014). Isto foi mostrado em estudos epigenéticos que propuseram induzir a obesidade paterna (McPherson *et al.*, 2014; Ornellas *et al.*, 2017). Ademais, os RNAs não-codificantes curtos (miRNAs) de espermatozoides funcionam como um vetor epigenético de herança paterna que pode ser induzida e alterada pelo ambiente (Dupont *et al.*, 2019).

Durante a gametogênese pode acontecer alteração no desenvolvimento dos gametas associadas a diferentes perturbações sofridas pelos progenitores, o que justifica estudar ambos os sexos de progenitores (em humanos e modelos animais) (Vige *et al.*, 2008; Gabory *et al.*, 2009). No corrente estudo, houve dimorfismo sexual em alguns resultados (ver figuras com o símbolo †).

A “programação fetal” quando a mãe treina natação antes e durante a gestação pode estar associada à melhora das condições hemodinâmicas fetais e placentárias, amenizando os efeitos paternos deletérios no feto (Martin *et al.*, 2017). O exercício físico aquático durante a gestação demonstra benefícios fetais e maternos em reduzir do empuxo (força em sentido contrário à gravidade), diminuindo o impacto e a chance de intercorrências maternas e fetais (diabetes gestacional, doença hipertensiva específica da gravidez, macrossomia fetal e obesidade ou diabetes ao nascimento) (Mottola e Artal, 2016; Szumilewicz *et al.*, 2019).

O exercício físico durante a gestação também reduz os riscos maternos e fetais, entre eles diminuição nos níveis plasmáticos de insulina, mantido pelas interações dos sistemas simpático-adrenal e neuro-humoral em animais e humanos, que pese o mecanismo de ação não ser plenamente conhecido (Ferrari *et al.*, 2018). Ressalta-se que o protocolo de intensidade moderada empregado no estudo atual esteve em acordo com as recomendações de atividade física durante a gestação para mulheres (Mottola *et al.*, 2018).

O exercício físico materno em mulheres grávidas obesas é utilizado para diminuir a massa corporal e as comorbidades associadas, com a vantagem de a mãe praticar um exercício físico durante a gestação e permanecer ativa durante a gravidez (Raipuria *et al.*, 2015). Quando o exercício físico é realizado somente antes da gravidez a prole mostra alteração em alguns genes relacionados ao estresse oxidativo (Songstad *et al.*, 2015). Da mesma forma, ratas exercitadas durante a gestação em intensidade submáxima constante, têm seus filhos com maior sensibilidade à insulina muscular do que os controles sedentários. Isto posto, é significativo também que as mulheres grávidas, apesar da elevação do perfil lipídico decorrente da gestação, após seis semanas de treinamento em bicicleta ergométrica, apresentam diminuição da taxa de insulina e glicemia de jejum (Szumilewicz *et al.*, 2019).

O treinamento de força em homens com esteatose hepática reduz significativa a gordura hepática, TAG hepático e massa hepática (van der Windt *et al.*, 2018). No nosso trabalho, a resistência (sobrecarga) foi a água, a qual no treinamento da natação materna atenuou a influência da obesidade do pai na prole. A natação materna mostrou benefícios na massa e TAG hepáticos, com diminuição da esteatose nos filhotes de ObP/TM, significando que o efeito da natação da mãe pode ser transferido à prole.

A prole de ObP/TM também apresentou melhora da beta-oxidação (Cpt1), diminuição da lipogênese (Srebp1c, Fas e Ppar  $\gamma$ ) e inflamação (Il1 $\beta$ , Il 6). O aumento da beta-oxidação observado em mães ativas tem sido relatado (Linden *et al.*, 2016), sugerindo que efeitos maternos benéficos podem ser transmitidos para a prole, concordando com os achados do corrente estudo.

O exercício físico tem efeitos benéficos na beta-oxidação com melhora da qualidade e função mitocondrial (Quiclet *et al.*, 2017; van der Windt *et al.*, 2018). A normalização da expressão de FAS na descendência ObP/TM limita a lipogênese,

indicando que a natação da mãe afetaria o metabolismo lipídico da prole. Da mesma forma, ratas que praticaram exercício espontâneo tiveram redução de Ppar  $\gamma$  e quando associado com exercício de alta intensidade do “*high intensity interval training*” ou HIIT, diminuíram também Srebp1c (Sheldon *et al.*, 2016). Em homens com esteatose hepática, o exercício físico de alta intensidade (HIIT) influenciou a expressão do domínio fibronectina tipo III contendo irisina e coativador do receptor ativado por proliferador  $\alpha$ , melhorando a biogênese mitocondrial e a beta-oxidação (Motta *et al.*, 2017). Filhotes de mães roedoras que treinaram com a “roda de corrida” espontânea ficaram protegidos da esteatose hepática na idade adulta (Sheldon *et al.*, 2016).

O exercício físico regular é essencial para o tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica, pois reduz o conteúdo de gordura intra-hepática, aumenta a beta-oxidação de ácidos graxos, induz a autofagia hepato-protetora, superexpressa no Ppar, atenua a apoptose de hepatócitos e melhora a sensibilidade à insulina (Farzanegi *et al.*, 2019). Assim, em um estudo experimental com exercício de alta intensidade (HIIT) em esteira em animais que foram induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica observou que os marcadores inflamatórios diminuíram com redução da esteatose e expectativa de progressão da doença hepática (Linden *et al.*, 2016).

Na presente investigação, o fato relevante é que a mãe se exercitou antes e durante a gestação para reverter estes efeitos deletérios da “programação pelo pai” com obesidade.

A relevância do tema e a riqueza de possíveis vias moleculares envolvidas são merecedoras de mais estudos futuros, experimentais e em humanos. É essencial entender mais profundamente a participação paterna na “programação fetal”, bem como a participação da mãe “nadadora” na recuperação/atenuação das vias metabólicas programadas pelo pai. O assunto interessa a diversos ramos do conhecimento tais como a obstetrícia, pediatria, endocrinologia, nutrição, além da educação física.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo mostrou evidências convincentes e confirmatórias de que o pai roedor obeso “programa” a massa corporal e a adiposidade dos filhos de ambos os sexos, incluindo alteração na glicemia de jejum e na sensibilidade à insulina. Além disso, o fígado da prole apresenta aumento da lipogênese e inflamação, com redução da beta-oxidação, levando a esteatose hepática mais intensa nesses animais. Lembramos que a esteatose é a primeira etapa da via da doença hepática gordurosa não alcoólica que evolui normalmente para esteatohepatite e cirrose hepática, com consequências nefastas que podem chegar ao carcinoma hepatocelular. A boa notícia é que a mãe que faz exercício físico durante a gravidez (natação) tem potencial de atenuar esses efeitos adversos nos filhotes de camundongos causados pelo pai obeso.

## REFERÊNCIAS

- AGUILA, MB *et al.* Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. **Liver International**, vol. 23, n. 5, p. 363-370, 2003.
- ARTAL, R; O'TOOLE, M. Guidelines of the American College of Obstetricians and Gynecologists for exercise during pregnancy and the postpartum period. **British Journal of Sports Medicine**, vol. 37, n. 1, p. 6-12, 2003.
- BARKER, DJ *et al.* Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **British Medical Journal**, vol. 301, n. 6746, p. 259-262, 1990.
- BARKER, DJ; CLARK, PM. Fetal undernutrition and disease in later life. **Reviews of Reproduction**, vol. 2, p. 105-112, 1997.
- BARKER, DJ *et al.* Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, vol. 341, p. 938-941, 1993.
- BARKER, DJ; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, vol. 1, p. 1077-1081, 1986.
- BARKER, DJ. Intrauterine programming of adult disease. **Molecular Medicine Today**, vol. 1, n. 9, p. 418- 423, 1995.
- BRINGHENTI, I *et al.* Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. **PLoS One**, vol. 8, n. 1, p. e55711, 2013.
- BRINGHENTI, I *et al.* Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. **Nutrition Research**, vol. 35, n. 2, p. 136-145, 2015.
- BRUCE, KD *et al.* Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. **Hepatology**, vol. 50, n. 6, p. 1796-1808, 2009.
- CARTER, LG *et al.* Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, vol. 45, n. 5, 832-840, 2013.
- CATTA-PRETA, M *et al.* A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch**, vol. 459, p. 477-485, 2011.
- CLAPP, JF *et al.* Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, vol. 186, n. 1, p. 142-147, 2002.
- COTMAN, CW; BERCHTOLD, NC; CHRISTIE, LA. Exercise builds brain health: key

roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in Neurosciences**, vol. 30, n. 9, p. 464-472, 2007.

DUNNETT, CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. **Journal of the American Statistical Association**, vol. 75, n. 372, p. 796-800, 1980.

DUPONT, C *et al.*. Role of miRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated With Paternal Diet-Induced Obesity. **Frontiers in Genetics**, vol. 10, p. 337, 2019.

FARZANEGI, P *et al.* Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. **European Journal of Sport Science**, vol. 19, n. 7, 994-1003, 2019.

FERNANDEZ-TWINN, DS *et al.* Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin- signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. **American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, vol. 288, n. 2, p. R368-373, 2005.

FERRARI, N *et al.* Exercise during pregnancy and its impact on mothers and offspring in humans and mice. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, vol. 9, n. 1, p. 63-76, 2018.

FRANKISH, H. Childhood obesity may be related to father's genes. **The Lancet**, vol. 358, p. 564, 2001.

GABORY, A; ATTIG, L; JUNIEN, C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 304, n. 1-2, p. 8-18, 2009.

GAEINI, A *et al.* Effects of exercise prior or during pregnancy in high fat diet fed mice alter bone gene expression of female offspring: An experimental study. **International Journal of Reproductive BioMedicine (Yazd)**, vol. 15, n. 2, p. 93-100, 2017.

GOYAL, D; LIMESAND, SW; GOYAL, R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. **The Journal of Endocrinology**, vol. 242, n. 1, p. T105-T119, 2019.

GREGORIO, BM *et al.* Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, vol. 203, n. 5, p. 495 e491-498, 2010.

GUILLEMETTE, L *et al.* Exercise in pregnancy and children's cardiometabolic risk factors: A systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine - Open**, vol. 4, artic number 35, 2018.

HARRIS, JE; BAER, LA; STANFORD, KI. Maternal Exercise Improves the Metabolic Health of Adult Offspring. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, vol. 29, n. 3, p. 164-177, 2018.

HEARD, E; MARTIENSSEN, RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, vol. 157, n. 1, p. 95-109, 2014.

HUR, SSJ; CROPLEY, JE; SUTER, CM. Paternal epigenetic programming: evolving metabolic disease risk. **Journal of Molecular Endocrinology**, vol. 58, n. 3, p. R159-R168, 2017.

KRAMER, MS; MCDONALD, SW. Aerobic exercise for women during pregnancy. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, vol. 19, n. 3, p. CD000180, 2006.

LAKER, RC *et al.* Exercise prevents maternal high-fat diet–induced hypermethylation of the Pgc-1 $\alpha$  gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. **Diabetes**, vol. 63, n. 5, p. 1605-1611, 2014.

LANGLEY-EVANS, SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. **Journal of Anatomy**, vol. 215, n. 1, p. 36-51, 2009.

LE STUNFF , C; FALLIN, D; BOUGNERES , P. Paternal transmission of the very common class I INS VNTR alleles predisposes to childhood obesity. **Nature Genetics**, vol. 29, p. 96-99, 2001.

LI, J *et al.* Paternal programming of offspring cardiometabolic diseases in later life. **Journal Hypertension**, vol. 34, n. 1, p. 2111-2126, 2016.

LINDEN, MA *et al.* Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis. **The Journal of Physiology**, vol. 594, n. 18, p. 5271-5284, 2016.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation Symposium**, vol. 156: p. 38-50; discussion 50-35, 1991.

MANDARIM-DE-LACERDA, CA. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MARTIN, E *et al.* Sexual epigenetic dimorphism in the human placenta: implications for susceptibility during the prenatal period. **Epigenomics**, vol. 9, n. 3, 267-278, 2017.

McPHERSON, NO *et al.* Paternal obesity, interventions, and mechanistic pathways to impaired health in offspring. **Annals of Nutrition & Metabolism**, vol. 64, n. 3-4, p. 231-238, 2014.

McPHERSON, NO *et al.* Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, vol. 308, n. 9, p. E805-821, 2015.

MOTTA, VF *et al.* Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, vol. 123, n. 4, p. 699-709, 2017.

MOTTOLA, MF; ARTAL, R. Fetal and maternal metabolic responses to exercise during pregnancy. **Early Human Development**, vol. 94, p. 33-41, 2016.

MOTTOLA, MF *et al.* 2019 Canadian guideline for physical activity throughout pregnancy. **British Journal of Sports Medicine**, vol. 52, n. 21, p. 1339-1346, 2018.

MURASHOV, AK *et al.* Paternal long- term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. **FASEB Journal**, vol. 30, n. 2, p. 775-784, 2016.

NG, SF *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, vol. 467, n. 7318, 963-966, 2010.

ORNELLAS, F *et al.* Father's obesity programs the adipose tissue in the offspring via the local renin- angiotensin system and MAPKs pathways, especially in adult male mice. **European Journal of Nutrition**, vol. 57, n. 5, p. 1901-1912, 2018.

ORNELLAS, F *et al.* Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. **Jornal de Pediatria**, vol. 93, n. 6, p. 551-559, 2017.

ORNELLAS, F *et al.* Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. **Life Sciences**, vol. 93, n. 12-14, p. 454-463, 2013.

ORNELLAS, F *et al.* Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. **Physiology & Behavior**, vol. 153, p. 47-55, 2016.

ORNELLAS, F *et al.* Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents. **PLoS One**, vol. 10, n. 4, p. e0124737, 2015.

PAWLAK, DB; KUSHNER, JA; LUDWIG, DS. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. **The Lancet**, vol. 364, p. 778-785, 2004.

PORTHA, B; GRANDJEAN, V; MOVASSAT, J. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. **Nutrients**, vol. 11, n. 2, p. 233, 2019.

QUICLET, C *et al.* Maternal exercise modifies body composition and energy substrates handling in male offspring fed a high-fat/high-sucrose diet. **The Journal of Physiology**, vol. 595, n. 23, p. 7049-7062, 2017.

QUICLET, C *et al.* Short-term and long-term effects of submaximal maternal exercise on offspring glucose homeostasis and pancreatic function. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, vol. 311, n. 2, p. E508-518, 2016.

RAIPURIA, M; BAHARI, H; MORRIS, MJ. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. **PLoS One**, vol. 10, n. 4, p. e0120980, 2015.

REEVES, PG; NIELSEN, FH; FAHEY, GC, Jr. 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. **The Journal of Nutrition**, vol. 123, n. 11: 1939-1951, 1993.

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

SITI, F *et al.* Maternal exercise before and during gestation modifies liver and muscle mitochondria in rat offspring. **Journal of Experimental Biology**, vol. 222, n. 10, p. jeb194969, 2019.

SONGSTAD, NT *et al.* Effects of high intensity interval training on pregnant rats, and the placenta, heart and liver of their fetuses. **PLoS ONE**, vol. 10, n. 11, p. e0143095, 2015.

SOUBRY, A *et al.* A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. **BioEssays**, vol. 36, n. 4, p. 359-371, 2014.

SZUMILEWICZ, A *et al.* Acute Postexercise Change in Circulating Irisin Is Related to More Favorable Lipid Profile in Pregnant Women Attending a Structured Exercise Program and to Less Favorable Lipid Profile in Controls: An Experimental Study with Two Groups. **International Journal of Endocrinology**, vol. 2019, Article ID 1932503, 2019.

TAREVNIC, R *et al.* Beneficial effects of maternal swimming during pregnancy on offspring metabolism when the father is obese. **Journal of Development Origins of Health and Disease**, vol. 10, p. 1-5, 2018.

VAN DER WINDT, DJ *et al.* The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. **Gene Expression**, vol. 18, n. 2, p. 89-101, 2018.

VIGE, A; GALLOU-KABANI, C; JUNIEN, C. Sexual dimorphism in non-Mendelian inheritance. **Pediatric Research**, vol. 63, p. 340-347, 2008.

VOLPATO, AM *et al.* Maternal High-Fat Diet Programs for Metabolic Disturbances in Offspring despite Leptin Sensitivity. **Neuroendocrinology**, vol. 96, n. 4, p. 272-284, 2012.

WATKINS, AJ; SINCLAIR, KD. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, vol. 306, n. 10, p. H1444- 1452, 2014.

## ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto da natação materna sobre os efeitos da obesidade paterna na prole: um estudo experimental", registrada com o nº 003/2018, sob a responsabilidade de **Márcia B. A. Mandarin de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 30/01/2018.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/01/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	80
Peso/Idade	18 g / 3 meses
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 30 de Janeiro de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

## ANEXO B - Primeiro artigo publicado

*Journal of Developmental  
Origins of Health and  
Disease*

cambridge.org/doh

### Brief Report

**Cite this article:** Tarevnic R, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB. (2019) Beneficial effects of maternal swimming during pregnancy on offspring metabolism when the father is obese. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 10: 502–506. doi: 10.1017/S2040174418001046

Received: 24 August 2018

Revised: 20 October 2018

Accepted: 15 November 2018

First published online: 18 December 2018

**Key words:**

epigenetics; father obesity; fetal programming

**Address for correspondence:**

M. B. Aguilá, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular. Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil. E-mail: mbagulla@uerj.br

© Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2018.

**CAMBRIDGE**  
UNIVERSITY PRESS

## Beneficial effects of maternal swimming during pregnancy on offspring metabolism when the father is obese

R. Tarevnic, F. Ornellas, C. A. Mandarim-de-Lacerda and M. B. Aguilá

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Brazil

### Abstract

We aimed to evaluate the impact of maternal exercise training on the offspring metabolism and body size caused by father obesity. C57BL/6 male 4-week-old mice were fed a high-fat diet (HF father) or control diet (C father), while equal age female mice were fed only a C diet and were separated into two groups: trained (T mother) and non-trained (NT mother), and at 12 weeks of age mice were mated. A continuous swimming protocol was applied for 10 weeks (before and during gestation), and offspring were followed since weaning until sacrifice (at 12 weeks of age). HF father, compared to C father, showed obesity, elevated total cholesterol (TC) and triglycerides (TG), and glucose intolerance. Both sexes HF/NT offspring showed hyperglycemia, glucose intolerance and high levels of TC and TG, without obesity. However, HF/T offspring showed data close to C/NT, demonstrating the beneficial effect of maternal exercise in the offspring of obese fathers.

### Introduction

The negative impact of maternal obesity on adiposity and offspring metabolism is already well established in the literature.<sup>1,2</sup> However, recent experimental findings have challenged conventional ideas about metabolic programming, suggesting that something else might be relevant through paternal programming.<sup>3,4</sup> The contribution of fathers to offspring programming is pertinent to Western society because about 70% of men of reproductive age are obese or overweight.<sup>5</sup>

Exercise training is an essential factor in reducing risk factors for obesity and diabetes, such as unbalanced energy metabolism, glucose utilization and insulin sensitivity.<sup>6</sup> The results on the progeny of exercise training during pregnancy have been well investigated, mainly focusing on fetal growth and metabolism indicating that the influence on male and female offspring is different, denoting sex dimorphism.<sup>7</sup>

We have the hypothesis of having a benefit for offspring that are programmed metabolically because the father is obese when the mother is not obese and does some physical training during pregnancy. Therefore, the study aimed to evaluate the impact of the maternal exercise training (swimming) in the offspring metabolically programmed by an obese father. In this short communication, we demonstrated the change in the body growth and metabolism of the puppies due to the obese father. The auspicious information is that the swimmer mother brings benefits to offspring.

### Material and methods

#### Animals and diets

All procedures were made to minimize suffering and protocols respect the current guidelines for experimentation with animals (National Institutes of Health Publication No. 85–23 revised, 1996) and ARRIVE guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>). The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of the State of Rio de Janeiro approved the protocol (Protocol Number CEUA/003/2018).

Male and female C57BL/6 mice were kept under controlled temperature conditions in the NexGen system (Allentown Inc., PA, USA, 21 ± 2°C and 12 h/12 h dark/light cycle) with free access to food and water. Four-week-old male mice were randomly divided into two groups and fed a high-fat diet (HF, designated as a HF father group, HF-Fa, *n* = 20) or a control diet (C, identified as a C father group, C-Fa, *n* = 20). Moreover, 4-week-old female mice were separated into a trained group (T, designated as a T mother group, T-Mo, *n* = 20) and a non-trained group (NT, identified as a NT mother group, NT-Mo, *n* = 20). Female mice were only fed with the C diet.

## ANEXO C - Confirmação de submissão do segundo artigo

Dear Mrs. Tarevnic,

You have been listed as a Co-Author of the following

submission: Journal: Nutrition Research

Title: Mother swimmer during gestation attenuates the hepatic adverse effects programmed by obese father in the offspring

Corresponding Author: Carlos Mandarim-de-Lacerda

Co-Authors: Renata Tarevnic, Fernanda Ornellas, Marcia Aguila

Carlos Mandarim-de-Lacerda submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=NR](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=NR)

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at [mandarim@uerj.br](mailto:mandarim@uerj.br).

Thank  
you,  
Nutrition  
Research