

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ASSOCIADO EM
EDUCAÇÃO FÍSICA – UEM/UEL

GISELLE CRISTINA BUENO

**Atividade física durante a gestação
em ratas alimentadas com dieta de
cafeteria promove proteção
hepática na prole aos 21 dias**

Maringá
2014

GISELLE CRISTINA BUENO

**Atividade física durante a gestação
em ratas alimentadas com dieta de
cafeteria promove proteção hepática
na prole aos 21 dias**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Associado em Educação Física
– UEM/UEL, para obtenção do
título de Mestre em Educação
Física.

Orientador: Profa. Dra. Solange Marta Franzói de Moraes

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B928a Bueno, Giselle Cristina
Atividade física durante a gestação em ratas alimentadas com dieta de cafeteria promove proteção hepática na prole aos 21 dias. -- Maringá, 2014.
41 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Solange Marta Franzói de Moraes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Educação Física, Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, 2014.

1. Programação metabólica. 2. Dieta de cafeteria. 3. Atividade física. I. Moraes, Solange Marta Franzói de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL. III. Universidade Estadual de Londrina. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.398

GISELLE CRISTINA BUENO

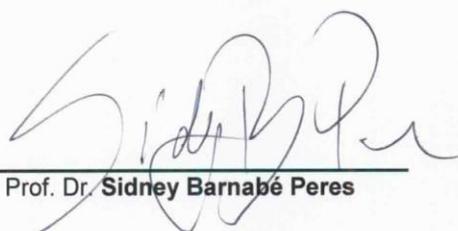
**Atividade física durante a gestação
em ratas alimentadas com dieta de
cafeteria promove proteção hepática
na prole aos 21 dias**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação Associado em
Educação Física – UEM/UEL, na área
de concentração em Estudos do
Movimento Humano, para obtenção do
título de Mestre.

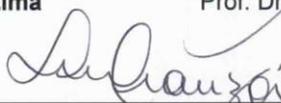
APROVADA em 25 de julho de 2014.



Prof. Dr. **Fábio Bessa Lima**



Prof. Dr. **Sidney Barnabé Peres**



Profa. Dra. **Solange Marta Franzói de Moraes**
(Orientadora)

Dedicatória

Dedico este trabalho a memória da minha amada avó, que me ensinou a ser uma verdadeira guerreira e a mulher mais importante da minha vida, minha MÃE.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que se fez presente em todos os momentos me mantendo forte, para vencer os obstáculos e adversidades dessa caminhada.

A toda minha Família, em especial a minha mãe, por me apoiar incondicionalmente e me inspirar com seu exemplo de guerreira.

A minha orientadora, Solange M.F. de Moraes, a grande responsável por não me deixar desistir, graças as suas palavras de apoio não me deixei abater pelas dificuldades de conquistar esse tão sonhado projeto.

Ao professor Sidney B. Peres, por todo apoio e disponibilidade nos momentos de dúvidas, meu muito obrigado.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Priscila, Paulo, Gustavo, Byanca, Carol, Elô, Danilo, Lidiane, Paulinho, Rodrigo que foram imprescindíveis na execução desse trabalho.

Ao professor Fábio Bessa Lima, por aceitar prontamente a participar da banca.

As técnicas e amigas do laboratório de fisiologia Marcia, Elizete e Valéria, pela disposição todos esses anos, me ajudando incondicionalmente, MUITOOOO OBRIGADA.

As técnicas do laboratório de Histologia Maria Euride, Maria dos Anjos e Maria Angela por colaborarem nas técnicas e pelo apoio dado.

A todos meus amigos que mesmo com minha ausência estiveram me apoiando, e com certeza foram primordiais para conseguir realizar esse sonho.

Aos meus alunos, por compreenderem as mudanças de horário, e estarem sempre ao meu lado, sou muitooo grata a todos.

E não poderia deixar de expressar meu especial agradecimento a duas pessoas tão especiais Maynara e Debora, minhas amigas, irmãs de coração, foram meu porto seguro, minha inspiração, não só para desenvolver esse trabalho, mas também por me proporcionaram um aprendizado de vida, não tenho palavras para agradecer vocês. Meu MUITOOOO OBRIGADA.

BUENO, Giselle Cristina. 2014. **Atividade física durante a gestação em ratas alimentadas com dieta de cafeteria promove proteção hepática na prole aos 21 dias.** 2014. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

RESUMO

Estudos têm mostrado que o uso de dietas hipercalóricas durante a gestação e lactação de ratos pode gerar prejuízos não só ao animal como também a sua prole, com o aparecimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares na vida adulta. Diante de tais evidências, levanta-se o questionamento se a inserção da atividade física durante a gestação pode prevenir ou ao menos minimizar os efeitos deletérios da dieta da mãe sobre a prole. Dessa forma o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da dieta de cafeteria e atividade física durante a gestação sobre a infiltração lipídica hepática e parâmetros musculares em prole de ratos ao desmame. Para a formação dos grupos experimentais ratas Wistar prenhes, com cerca de 70 dias, foram submetidas a dieta de cafeteria e a atividade física em esteira rolante, sendo a dieta mantida até o final da lactação (42 dias) e a atividade física somente durante a gestação (18 dias). Foram formados os seguintes grupos de filhotes de 21 dias padronizados 8 animais por rata, divididos em: prole de mães controle sedentária (CS), prole de mães controle treinada (CT), prole de mães cafeteria sedentária (CaS) e prole de mães cafeteria treinada (CaT). Após o desmame, aos 21 dias completos sob anestesia e jejum 8 horas os filhotes machos tiveram a glicemia medida via punção caudal em glicosímetro e posteriormente foram sacrificados para coleta de sangue, fígado e músculo gastrocnêmio. Para avaliação da infiltração lipídica e área muscular foram utilizadas as técnicas histoquímicas de Sudan III e Hematoxilina e eosina (HE), respectivamente. A dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e da creatina cinase (CK) foram utilizadas como marcadores de lesão hepática e muscular, respectivamente. Como resultado observou-se que a dieta de cafeteria na gestação e lactação induziu prejuízos no fígado da prole ao desmame, evidenciados pelo maior acúmulo de infiltrado lipídico e aumentos nas concentrações de AST e ALT, porém a atividade física foi capaz de reduzir os níveis de infiltração. Não foram observadas diferenças nas áreas das fibras musculares do gastrocnêmio, porém tanto a dieta como atividade física elevaram os níveis de CK. Podemos concluir que atividade física inserida durante a gestação foi contundente para amenizar os efeitos deletérios da dieta na infiltração lipídica, uma vez que os grupos exercitados resultaram em menores valores de área infiltrada comparada aos grupos controles ao desmame..

Palavras-Chave: Programação metabólica. Dieta de cafeteria. Atividade física.

BUENO, Giselle Cristina. 2014. Physical activity during pregnancy in rats fed with cafeteria diet promotes hepatic protection in offspring at weaning. 2014. PhD Thesis (Master Program in Physical Education) – Center for Health Sciences. State University of Maringá, Maringá, 2014.

ABSTRACT

Studies have shown that the use of hypercaloric diets during pregnancy and lactation in rats may cause deleterious effects not only to genitors but also their offspring, with the onset of metabolic and cardiovascular disorders in adulthood. Such evidence leads us to the question whether the insertion of physical activity during pregnancy can prevent or at least minimize the deleterious effects of maternal diet on offspring at weaning. Thus the aim of the study was to evaluate the effect of cafeteria diet and physical activity during pregnancy on hepatic fatty infiltration and muscle morphology in offspring of rats after weaning. To constitute the experimental groups pregnant female Wistar rats, 70 days old, were fed a chow or cafeteria diet and submitted to a treadmill light physical exercise during 18 days, avoiding the last 3 days of gestation. After birth, only the cafeteria diet was kept and the following groups randomly assigned: Offspring of sedentary control (SC), offspring of trained control (TC), offspring of sedentary cafeteria (CaS) and offspring of trained cafeteria (CaT). After the end of the weaning period, 21 days, 8 hours fasting pups were anesthetized and caudal blood collected to determine glycemia using a glucometer. Soon after, the animals were euthanized and blood, liver and gastrocnemius muscle excised. The histochemical techniques Sudan III and hematoxylin and eosin (HE), respectively, were employed for evaluation of fatty infiltration and muscle area. The dosage of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CK) were used as markers of liver and muscle injury, respectively. As a result it was observed that the cafeteria diet during gestation and lactation induced liver damage in the offspring at weaning, evidenced by increased accumulation of lipid infiltration and increases in the concentrations of AST and ALT. On the other hand, physical activity was able to reduce the level of infiltration. No differences were observed in gastrocnemius muscle fiber area, but both diet and physical activity increased CK levels. In summary, we conclude that physical activity during pregnancy was efficient to mitigate the deleterious effects of diet on lipid infiltration, since the exercise groups presented lower values of infiltration area compared with the control groups at weaning.

Keywords: Metabolic programming. Cafeteria diet. Exercise.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Desenho Experimental. 01
- Figura 2 -** Fotomicrografia de fígado evidenciando inclusões lipídicas. Em A) filhote de ratas controles sedentária (CS), B) filhote de controle treinada (CT), C) filhote de cafeteria sedentária (CaS) e D) filhote de cafeteria treinada (CaT). 21
- Figura 3 -** Área de infiltração lipídica das proles de mães controle sedentários (CS), controles treinados (CT), cafeteria sedentários (CaS) e cafeteria treinado (CaT). 22
- Figura 4 -** Fotomicrografia da área da fibra muscular (μm^2) de proles de mães, sendo alimentadas com dieta padrão (C) ou dieta de cafeteria (Ca) que fizeram exercício (T) ou permaneceram sedentárias (S) durante a gestação durante a gestação e lactação. 24
- Figura 5 -** Área da fibra muscular do gastrocnêmio das proles aos 21 dias. CS controle sedentário, CT controle treinado, CaS cafeteria sedentário, CT cafeteria treinado. Valores expressam média \pm EPM de 5 animais por grupo. 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cardápio semanal dos alimentos administrados a cada dia no grupo da dieta de cafeteria	12
Tabela 2 -	Percentual do consumo alimentar dos macronutrientes das ratas durante a gestação e lactação	12
Tabela 3 -	Protocolo exercício físico em esteira para ratas prenhas, adaptado de AKSU, 2012	13
Tabela 4 -	Peso corporal, índice de Lee e Glicemia das proles aos 21 dias	19
Tabela 5 -	Valores de peso do fígado em (g), peso do fígado corrigido (mg/peso corporal), e valores plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e razão entre AST/ALT das proles de 21 dias	20
Tabela 6 -	Valores de peso absoluto e relativo do gastrocnêmio, e creatina cinase (CK) das proles aos 21 dias	23

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina amino-transferase
AST	Aspartato amino-transferase
CaS	Cafeteria sedentário
CaT	Cafeteria treinado
CS	Controle sedentário
CT	Controle treinado
CK	Creatina cinase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEFE	Centro de Educação Física e Esporte
EPM	Erro padrão da média
GLUT- 4	Proteína Transportadora de glicose do tipo 4
H.E	Hematoxilina de Harris e Eosina
IRS	Substrato do receptor de insulina
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 quinase
NAFLD	Esteatose hepática não alcoólica
NaOH	Hidróxido de sódio
SM	Síndrome metabólica
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 Objetivo Geral	03
2.2 Objetivos Específicos	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1 Obesidade e suas conseqüências	04
3.2 Esteatose Hepática não alcoólica NAFLD	05
3.3 Programação Metabólica	07
3.4 Exercício Físico	09
4 MÉTODOS	11
4.1 Animais.....	11
4.2 Dieta alimentar.....	11
4.3 Treinamento físico.....	13
4.4 Grupo experimentais.....	14
4.5 Caracterização dos animais.....	15
4.6 Dosagens bioquímicas.....	15
4.6.1 Determinação de AST (TGO).....	15
4.6.2 Determinação de ALT (TGP).....	16
4.6.3 Determinação de Creatina cinase(CK).....	16
4.7 Análises histológicas	16
4.7.1 Análise morfológica e histoquímica do fígado.....	16
4.7.2 Análise morfológica e histológica do músculo.....	17
4.8 Análise estatística.....	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um fenômeno multifatorial, relacionado a fatores comportamentais, metabólicos e biológicos, caracterizado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo decorrente de um desequilíbrio crônico entre a energia ingerida e a energia gasta (MARQUES-LOPES et al.,2004; BOUCHARD, 2003).

De acordo com a organização mundial de saúde, a obesidade tornou-se uma epidemia mundial nos últimos anos existindo aproximadamente 1,5 bilhões de adultos com excesso de peso no mundo, dos quais 200 milhões são obesos, sendo que este estado metabólico afeta cada vez mais pessoas jovens. Aproximadamente 22 milhões de crianças, menores de 5 anos de idade estão acima do peso, homens e mulheres parecem ser afetados de forma diferente, sendo a taxa de obesidade maiores entre as mulheres (WHO, 2012).

Dentre as alterações metabólicas causadas pela obesidade encontramos os distúrbios na secreção e ação da insulina na qual ocasionam diversas anormalidades metabólicas, incluindo a hiperglicemia, o descontrole da produção hepática de glicose e dislipidemia que posteriormente se associam a uma gama de doenças metabólicas, como o diabetes tipo II, a hipertensão, doenças cardiovasculares e hepáticas (REAVEN et al.,1988; MUIOIO ; NEWGARD, 2008).

Para se investigar melhor a obesidade e seus efeitos deletérios, estudos em modelos animais têm ofertado diferentes padrões de dietas hipercalóricas para a indução da obesidade (SILVA; MELLO, 2000; ZHANG et al., 2004; FRANCO et al., 2012). Um modelo de indução de obesidade bem utilizado é o da dieta “ocidentalizada” ou dieta de cafeteria, a qual possui alta palatabilidade, promovendo aumento do consumo destes alimentos com teor mais elevado de gordura em detrimento a ração padrão. Estudos demonstraram que esta dieta hipercalórica produz um incremento de peso corporal de aproximadamente 30–40% ao final de 12 semanas, além de produzir aumento significativo na quantidade de gordura visceral, causar resistência à insulina e hiperleptinemia (CESARETTI et al., 2005; PRADA et al., 2005; BAYOL et al.,2005; BAYOL et al.,2010).

Evidências em modelos experimentais sugerem que a adoção da dieta de cafeteria pode prejudicar não só o animal como também sua prole. Bayol et al. (2005; 2010) observaram em seus estudos que os prejuízos transmitidos para a prole são decorrentes da dieta de cafeteria tanto na gestação quanto na lactação, as quais afetam o desenvolvimento do músculo esquelético, aumento da adiposidade e também indução de alterações celulares e moleculares associadas a desordens metabólicas relacionadas à resistência a insulina, diabetes tipo II e doença hepática não alcoólica.

Dessa forma vem crescendo o interesse de pesquisas nas quais a obesidade e doenças relacionadas podem ser programadas durante a vida fetal de um indivíduo. (BARKER et al., 1993; SLOBODA; VICKERS, 2011). Essas afirmações corroboram com estudos que apontam que o alto teor de gordura maternal ou colesterol por excesso de alimentação durante a gestação e lactação em roedores resulta em um fenótipo na prole que se assemelha ao do humano com síndrome metabólica, assim sugere que o feto pode também desenvolver doenças cardiovasculares, homeostase anormal da glicose, aumento da pressão sanguínea, alteração no perfil de lipídios séricos, aumento da adiposidade na vida adulta (ARMITAGE et al., 2004; ARMITAGE et al., 2005).

Neste contexto, o exercício físico pode ser utilizado como um mecanismo de intervenção para beneficiar a melhora do quadro de obesidade acompanhado de resistência à insulina por diminuir a expressão e/ ou atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo à ação da insulina em vários tecidos, incluindo músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (OLIVEIRA et al., 2011).

Diante das evidências de que a dieta de cafeteria durante a gestação induz um quadro de desajustes metabólicos na prole, levanta-se o questionamento se a inserção de atividade física durante a gestação pode prevenir ou minimizar esses efeitos metabólicos deletérios da dieta de cafeteria sobre a prole. Dessa forma torna-se necessário o desenvolvimento de novos estudos que se comprometam a desvendar tais lacunas existentes.

OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da atividade física e dieta de cafeteria durante a gestação e lactação sobre parâmetros morfofisiológicos hepáticos e musculares na prole ao final do período de amamentação.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a infiltração lipídica no fígado, o comprometimento da função hepática através das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e morfológicamente através de técnica histológica.

Verificar se o exercício e/ou a dieta levou à alterações na morfologia dos músculos esqueléticos gastrocnêmio, através dos níveis de creatina cinase (CK) e área da fibra muscular.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 OBESIDADE E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Atualmente a obesidade é uma preocupação mundial, dados estatísticos demonstram um aumento acentuado de sua incidência, alcançando um destaque no cenário epidemiológico mundial, e identificar as causas dos determinantes do excesso de peso compõe um complexo conjunto de fatores biológicos, comportamentais e ambientais no qual se relacionam e se potencializam mutuamente (ENES et al., 2010).

Devido ao rápido aumento na prevalência de obesidade e as graves consequências para a saúde, a obesidade é comumente considerado um dos desafios mais graves de saúde pública do início do século 21 (WHO, 2012).

O meio ambiente nutricional desfavorável e um estilo de vida cada vez mais sedentário contribui para o desenvolvimento da obesidade, e evidências mostram que a adversidade nutricional precoce contribui para o desenvolvimento de desordens metabólicas a longo prazo (HENRIKEN et al., 2002; LI; SLOBODA; VICKERS, 2011)

Os efeitos da obesidade em idade precoce poderão ser notados ainda em longo prazo, tendo sido relatado na literatura um risco de mortalidade aumentado, especialmente por doença coronariana, nos adultos que foram obesos durante a infância e a adolescência (ENES et al., 2010). Segundo Guo e Chumlea (1999), a probabilidade de adolescentes que apresentam obesidade aos 18 anos, desenvolverem esses distúrbio na vida adulta é de 34% para os homens e 37% para as mulheres.

Como já é bem descrito a obesidade esta associada a uma série de doenças que afetam vários órgãos e o sistema endócrino, em especial destaca-se o fígado, uma vez que a obesidade, a resistência insulina e diabetes estão associados a doença do fígado gorduroso não-alcoólica (esteatose hepática) (ADANS et al., 2007; NEUSCHAWANDER, 2005).

3.2 ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) é definida como um acúmulo de gordura, principalmente triglicerídeos, caracterizado pela mudança nas gorduras macrovesicular no fígado, pode ser definido pela presença de infiltração gorda em mais de 5% dos hepatócitos, detectada por técnicas de imagem ou por histologia (biopsia hepática) na ausência de alcoolismo (consumo diário <20g) e sem evidencia de outras causas de doença hepática (CHALASANI et al., 2012). É uma doença lentamente progressiva, representa um espectro de diferente gravidade, que pode variar entre a simples esteatose até a esteato-hepatite (NASH), fibrose crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (LALL et al., 2008; FIUZA, 2013).

A NAFLD constitui uma das formas mais freqüentes de doença hepática crônica no mundo ocidental e é considerada como a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM), uma vez que a sua patogênese esta relacionada com a resistência a insulina, a obesidade e a diabetes também são fatores de risco para a NAFLD (ADANS et al., 2005; FIUZA, 2013).

Na esteatose ocorre aumento da lipólise e aumento dos ácidos graxos livres, devido à resistência insulínica. Através da peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio são geradas como resultante aumento das citocinas pró-inflamatórias, levando a inflamação celular, deposição aumentada de colágeno através da ativação de células estreladas (BAKER et al., 2006).

Diante de tais informações, é válido ressaltar que o papel do fígado nessa patologia, uma vez que o mesmo atua como um centro metabólico e regula a necessidade de ácidos graxos no organismo, que também podem ser armazenados em partículas de gordura, fornecendo energia para o tecido hepático. O excesso de glicose pode ser convertido em ácidos graxos e formar uma reserva de energia que, posteriormente, dependendo das circunstâncias, podem ser transformados em triglicerídeos (ANGULO et al., 1999).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos no surgimento da esteatose hepática, dentre eles, pode ser o aporte de ácidos graxos e gorduras da dieta em grandes quantidades, a secreção inadequada de triglicerídeos pelos hepatócitos, a

síntese aumentada de ácidos graxos pela mitocôndria e insuficiente oxidação e, ou mesmo o carboidratos em excesso que podem ser levados ao fígado e convertidos em ácidos graxos (REID, 2001).

A crescente incidência da obesidade e sua associação com NAFLD apresenta um dado preocupante uma vez que se torna um problema de saúde pública cada vez mais grave, considerando os lentos processos na identificação da patologia, sendo de suma importância medidas preventivas e tratamento da obesidade. Assim, esforços concentram-se em corrigir ou melhorar a resistência à insulina e a perda de peso com exercício aeróbico e dieta adequada (BAKER et al., 2006; CHAN et al., 2007).

A insulina também acomete o metabolismo lipídico, aumentando a síntese de lipídios no fígado e nas células de gordura, atenuando a liberação de ácidos graxos a partir de triglicerídeos no tecido adiposo e no músculo. Dessa forma a resistência a insulina ocorre quando as concentrações normais do hormônio são insuficientes para regular esses processos de forma adequada ocorrido por um defeito na transdução de sinal (PESSIN et al., 2000).

Logo, a hiperinsulemia e a resistência a insulina, ambas são disfunções metabólicas envolvidas na patogênese do diabetes tipo 2 e, quando presente em associação à dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial sistêmica constituem um quadro de síndrome metabólica, que é um fator de risco para diversas doenças cardiovasculares (KADOWAKI, 2000; CESARETTI et al., 2006).

Além das complicações citadas acima, a insulina também apresenta atividades anti-inflamatórias, de forma que um estado de resistência a insulina não apenas reduz a utilização de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, mas também estimula a sinalização pró- inflamatória (MACHADO et al., 2006). A resistência à insulina pode aumentar o acúmulo de gordura hepática aumentando a entrega de ácidos graxos livres para o fígado e por o efeito de hiperinsulinemia estimular os processos anabólicos, associado ao desenvolvimento do quadro de esteatose hepática (UTZSCHNEIDER & KAHN, 2006).

3.3 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

A programação metabólica é o fenômeno pelo qual um estímulo ou estresse exercido durante um período crítico do desenvolvimento precoce de um organismo altera permanentemente a sua anatomia, sua fisiologia e o seu metabolismo, sendo as consequências por vezes apenas observadas numa fase mais tardia da trajetória da vida (RÊGO, 2011).

Contudo, a programação metabólica tem se apoiado na hipótese da “origem fetal”, na qual um ambiente uterino adverso se correlaciona com um risco aumentado de doenças crônicas degenerativas na idade adulta (BAKER, 1993). Dessa forma há um impacto na nutrição precoce, particularmente nutrição fetal, na expressão futura do binômio saúde/doença de um indivíduo (RÊGO, 2011).

As associações epidemiológicas entre os efeitos adversos do ambiente intra-uterino e o aparecimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares na vida adulta conduziram ao conceito de “programação fetal”, e levanta a hipótese de que um ambiente uterino adverso altera o metabolismo fetal e o meio hormonal, resultando em um desenvolvimento de adaptações para garantir a sobrevivência do feto, contudo essas mesmas respostas adaptativas podem conduzir alterações metabólicas e, doenças cardiovasculares e distúrbios no sistema endócrino (VICKERS et al., 2000).

No entanto, o meio ambiente, durante os períodos de plasticidade do desenvolvimento na vida pós-natal, também pode funcionar como um "programa". Evidências sugerem que o feto pode ser propenso ao desenvolvimento de doença cardiovascular na vida adulta através da exposição a os excessos da alimentação materna (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005).

Revisão bibliográfica envolvendo estudos epidemiológicos com humanos e modelos animais com intervenções dietéticas apropriadas forneceram evidências sugerindo que a nutrição materna desequilibrada e distúrbios metabólicos durante o desenvolvimento fetal podem gerar um efeito persistente na saúde da prole, podendo ser transmitido para a próxima geração (GALLOU-KABANI et al., 2007).

O alto teor de gordura maternal ou colesterol provindo do excesso de alimentação durante a gravidez e lactação em roedores resulta em um fenótipo da prole

que se assemelha a síndrome metabólica humana, causando dessa forma um quadro de anormalidade na homeostase da glicose, elevação da pressão arterial, perfis séricos anormais, aumento da adiposidade, lesões pró-aterogênicas e hiperleptinemia (ARMITAGE et al., 2004; TAYLOR et al., 2004; TAYLOR et al., 2005).

Além disso, durante a gestação, a indução a dietas em animais, altamente palatável com baixo teor protéico levam a uma restrição do crescimento da prole no útero, e se durante a lactação o baixo teor protéico permanece, a prole mantém a restrição de crescimento mesmo que após o desmame receba uma dieta padrão, desenvolvendo posteriormente diabetes, resistência à insulina, hipertensão, síndrome metabólica e redução da massa muscular (PETRY et al., 2001).

Um grupo de pesquisadores desenvolveu um modelo animal para examinar a influência da dieta de cafeteria materna durante a gestação e lactação, para verificar o efeito da dieta sobre a prole, dessa forma promoveu uma pré-disposição ao excesso de peso, uma preferência por dieta altamente palatável, adiposidade abdominal, bem como hiperglicemia, hiperinsulemia, hiperleptinemia, acúmulo de lipídios no músculo, sinalizando sem dúvida uma perturbação metabólica precoce (BAYOL et al., 2007; BAYOL et al., 2008).

Outros fatores metabólicos que também estão envolvidos na utilização da dieta de cafeteria materna durante a gestação e lactação são o desenvolvimento de esteatose hepática e estresse oxidativo no fígado fetal, e esses animais mesmo que após o desmame receberam dieta padrão ainda assim mantiveram o aumento da esteatose hepática e resposta do estresse oxidativo, indicando que o dano é irreversível (BAYOL et al., 2010).

3.4 EXERCÍCIO FÍSICO

É consensual na literatura que o crescimento da prevalência de excesso de peso esta relacionado a um maior consumo de alimentos com elevada densidade energética e especialmente ricos em lipídios e carboidratos simples, porém esse fato isoladamente não é capaz de explicar o aumento exponencial da obesidade no quadro mundial, assim a redução dos níveis de atividade física também parece exercer papel fundamental nesse processo, a prática da atividade física entre jovens apresenta uma relação inversa com o risco de doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas a obesidade (ENES; SLATER, 2010).

A obesidade mostra um aumento na sua prevalência e caracteriza-se como um fator de risco para a esteatose hepática, na qual esta inserida em uma síndrome metabólica sistêmica que inclui também a resistência à insulina, hiperlipidemia e hipertensão, o exercício pode promover adaptações como um mecanismo de tratamento para melhorar esse quadro (LALL et al., 2008).

Nesse sentido, atividade física realizada regularmente leva a uma melhora da homeostase da glicose, como resultado da melhora a tolerância à glicose e redução da secreção de insulina. O aumento do fluxo sanguíneo muscular e o aumento do receptor de insulina são importantes mecanismos envolvidos na maior sensibilidade à insulina observada em seres humanos e animais treinados (DELA et al., 1993).

O papel anti-inflamatório do exercício físico também tem sido amplamente relatado, com foco nas significativas alterações moleculares. Como os exercícios físicos aeróbios os quais melhoram a sensibilidade à insulina, aumentando a fosforilação das moléculas IRS-1 e IRS-2, bem como a associação dessas proteínas com a PI3K, elevando os efeitos fisiológicos finais da insulina (PAULI et al., 2008; SCHENK; HOROWITZ, 2007).

Estudos evidenciando que o exercício tem um papel importante na regulação da captação de glicose não são recentes, Pauli et al. (2009) fez um levantamento sobre a perspectiva histórica do exercício físico e sinalização da insulina e verificou que seus primeiros achados sobre o efeito favorável do processo de contração muscular na captação de glicose surgiram em 1887, quando Chauveau e Kaufmann reportaram

redução da quantidade de glicose proveniente da musculatura do masseter de cavalos enquanto eles mastigavam feno. Desde então cresceram as investigações buscando elucidar a possível interação entre insulina e o exercício na regulação da captação de glicose.

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal total e exerce papel primordial no metabolismo da glicose, sendo ele responsável em média por 30% do consumo energético, além de ser um dos principais tecidos responsáveis pela captação, liberação e estocagem de glicose (PAULI et al., 2009). Dessa forma a contração muscular é eficiente em causar melhora na oxidação de gordura e aumentar a sensibilidade à insulina (THYFAULT et al., 2008).

Em estudo realizado por Luciano et al. (2002) foi verificado que o exercício aeróbio melhora a sensibilidade à insulina, aumentando a fosforilação do IRS1 e IRS2, bem como a associação dessas proteínas com a PI3K em animais estimulados com insulina.

Evidências mostram que esse o exercício aeróbio diminui a quantidade de lipídios e aumenta a capacidade de oxidação lipídica das células musculares, portanto, pode prevenir a resistência à insulina corrigindo a incompatibilidade entre a absorção e a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético. Além disso, foi comprovado que uma única sessão de exercício aeróbio aumenta a absorção de glicose pelo músculo durante o exercício, aumenta a capacidade da insulina para promover a absorção da glicose e aumenta também o acúmulo de glicogênio após o exercício, os quais são importantes para o controle da glicose no sangue, também é descrito que o exercício resistido tem se mostrado eficaz na prevenção da resistência a insulina (TURCOTTE; FISHER, 2008).

As informações descritas acima são importantes para entender o papel da resistência a insulina no quadro de esteatose hepática uma vez que hiperinsulemia aumenta os níveis séricos dos ácidos graxos livres, estes são absorvidos pelo fígado, produzindo triglicerídeos e desenvolvendo um quadro de esteatose hepática (ADANS et al., 2005). O tratamento para esse quadro inclui a perda de peso através do exercício físico atrelado a uma dieta adequada e o controle de fatores de riscos metabólicos (LALL et al., 2008; ADANS et al., 2005).

4 MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo em questão teve o seu protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentações (CEAE-UEM) (Protocolo nº 022/2010) (**ANEXO I**).

Foram utilizados filhotes machos de 21 dias de vida gerados de ratas Wistar com aproximadamente 70 dias de vida. Para a obtenção dos filhotes, as ratas oriundas do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram alocadas em caixas com ratos machos para cruzamento, numa proporção de três fêmeas para cada macho. Diariamente foi feito o ciclo estral das ratas, por meio do esfregaço, até a detecção da presença de espermatozoides no material coletado, considerando este o primeiro dia de prenhez. As ratas prenhes foram separadas em grupos com dieta controle ou dieta cafeteria durante toda a gestação e lactação, sedentárias ou treinadas no período da gestação. Os machos foram eutanasiados com dose supra fisiológica de anestésico. Após o nascimento, a ninhada foi padronizada com 8 animais durante o período de lactação (21 dias), filhotes fêmeas eram mantidos à ninhada, caso fosse necessário completar o número padronizado de animais neste período lactacional, sendo posteriormente direcionadas essas fêmeas a outros pesquisadores.

Todos os animais envolvidos na pesquisa foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas submetidos à período 12 horas claro e 12 horas escuro e temperatura controlada de 23⁰C.

4.2 Dieta alimentar

A dieta de cafeteria foi administrada as ratas a partir da detecção da prenhez, sendo constituída de alimentos como bolacha recheada, bolacha waffer, salsicha, mortadela, chips sabor queijo e sabor bacon, chocolate, pão francês, refrigerante e ração, disponibilizados conforme a quantidade consumida (Tabela 1). Para o grupo

controle, foi oferecida a dieta padrão através da ração *Nuvilab*[®] (com composição seguindo as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA para alimentos de ratos de laboratório) e água *ad libitum*. Foi realizado um controle diário do consumo de líquidos e do consumo alimentar de ambos os grupos, apresentados em percentual calórico dos macronutrientes (Tabela 2) .

Tabela 1. Cardápio semanal dos alimentos administrados a cada dia no grupo da dieta de cafeteria.

<i>Dias da semana</i>	<i>Alimentos</i>
Segunda-feira	Mortadela, chips de bacon, bolacha waffer,ração, água, refrigerante de cola
Terça-feira	Salsicha, chips de queijo, bolacha recheada, ração, água, refrigerante de guaraná
Quarta-feira	Chocolate, bolacha waffer, pão francês, ração, água, refrigerante de cola
Quinta-feira	Mortadela, chips de bacon, bolacha waffer,ração, água, refrigerante de cola
Sexta-feira	Salsicha, chips de queijo, bolacha recheada, ração, água, refrigerante de guaraná

Tabela 2. Percentual do consumo alimentar dos macronutrientes das ratas durante a gestação e lactação.

<i>Macronutrientes</i>	<i>CS</i>	<i>CT</i>	<i>CaS</i>	<i>CaT</i>
Proteína %	26,58	25,54	16,43	17,92
Carboidrato %	65,25	62,69	59,46	50,25
Gordura %	8,17	11,77	24,11	31,83

4.3 Treinamento físico

Logo que detectado a prenhez foi iniciado o protocolo de exercício físico em esteira rolante computadorizada e adaptada para treinar 8 animais (Classic, Inbrasport, Porto Alegre – RS) e a administração das dietas controle (C) ou cafeteria (Ca) concomitantemente.

As ratas realizaram uma adaptação pré-prenhez de uma semana com duração de 10 minutos por sessão de treino a uma velocidade de 0,4 km/h nos três primeiros dias e a 0,6 km/h nos 4 dias seguintes.

O treinamento físico foi realizado durante toda a gestação das ratas, com incremento de velocidade a cada 5 dias, nos 15 primeiros dias, e com decréscimo de incremento do 15° ao 18° dia de gestação, sendo que após esse período foi cessada a atividade física. O tempo de treino diário foi de 30 minutos. Além disso, por ser um protocolo em período gestacional, o treinamento apresentou uma sequência decrescente para não prejudicar a gestação das ratas. Sendo assim, o protocolo de treinamento, seguiu a seguinte sequência:

Tabela 3. Protocolo exercício físico em esteira para ratas prenhas, adaptado de AKSU, 2012.

<i>Dia</i>	<i>Velocidade (km/h)</i>	<i>Tempo (minutos)</i>
1° ao 5°	0,4	30
6° ao 10°	0,5	30
11° ao 15°	0,6	30
16° ao 18°	0,4	30

O treinamento não ocorreu durante a lactação para nenhum dos grupos para não interferir na amamentação dos filhotes.

4.4 Grupos experimentais

Baseado no consumo de dieta de cafeteria ou dieta controle durante a gestação e lactação, e da realização ou não de exercício físico aeróbio somente durante a gestação, formou-se os seguintes grupos:

Grupo 1: Proles (21 dias) de mães alimentadas com dieta controle durante a gestação e lactação, sem treinamento físico (CS);

Grupo 2: Proles (21 dias) de mães alimentadas com dieta controle durante a gestação e lactação, com treinamento físico durante a gestação (CT);

Grupo 3: Proles (21 dias) de mães alimentadas com dieta de cafeteria durante a gestação e lactação, sem treinamento físico (CaS);

Grupo 4: Proles (21 dias) de mães alimentadas com dieta de cafeteria durante a gestação e lactação, com treinamento físico durante a gestação (CaT);

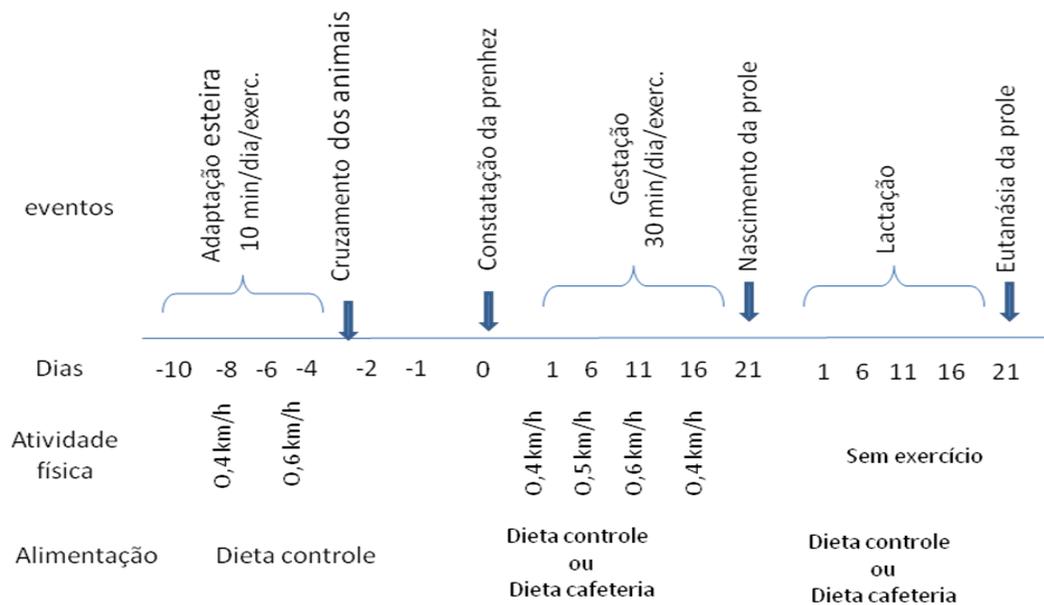


Figura 1. Desenho Experimental

4.5 Caracterização dos animais

No dia do nascimento dos animais, os filhotes machos foram pesados. Ao quarto dia de nascimento, a ninhada foi padronizada em 8 filhotes, e, caso houvesse filhotes excedentes fêmeas ou machos, estes foram encaminhados a outros pesquisadores.

Assim que os filhotes completaram 21 dias, em estado de jejum, foram anestesiados com administração de cetamina e xilazina (0,1mL/100g peso corporal do animal, via intramuscular). Foi realizada uma punção cardíaca para coleta de sangue e posterior laparotomia mediana para coleta de tecido hepático e muscular. Posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia após secção do músculo diafragma.

Foram coletados o fígado e o músculo gastrocnêmio, pesados e imediatamente após clampeados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. As amostras de sangue foram utilizadas para determinação da glicemia, enzimas Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK) por métodos colorimétricos utilizando kits da Gold Analisa (Belo Horizonte, MG).

4.6 Dosagens bioquímicas

4.6.1. Determinação da AST (TGO)

A enzima hepática aspartato amino-transferase (AST) foi determinada segundo as instruções do fabricante. Uma amostra de 250µl de TGO substrato foi incubado por 2 minutos a 37°C e adicionado 100µl de plasma. Após 30 minutos de incubação a 37°C adicionou-se 250µl de reagente de cor. Esta mistura permaneceu por 20 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se então 2,5 ml de NaOH e aguardou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. A TGO catalisa a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. Este último reage com a 2-4-difenilhidrazina formando hidrazona que adquire coloração máxima

pela adição do NaOH. A intensidade de coloração, medida em 505nm, é proporcional à atividade da enzima na amostra.

4.6.2. Determinação da ALT (TGP)

A enzima hepática alanina amino-transferase (ALT) foi determinada segundo instruções do fabricante. Uma amostra de 250µl de TGP-substrato foi incubada à temperatura de 37°C por 2 minutos e adicionado 50µl de plasma. Após 30 minutos de incubação a 37°C adicionou-se 250µl de reagente de cor. Esta mistura permaneceu por 20 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se então 2,5 ml de NaOH e após 5 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura. A TGP catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. Este último reage com a 2-4-difenilhidrazina formando hidrazona, que adquire coloração máxima pela adição do NaOH. A intensidade de coloração, medida em 505nm, é proporcional à atividade da enzima na amostra.

4.6.3. Determinação da Creatina cinase (CK)

A determinação da CK foi realizada utilizando-se o kit de CK-NAC- PP da GOLD-ANALISA (Belo Horizonte, MG),. no qual 20µl de soro foi adicionado a 1000µl de reagente de cor. Este método foi realizado no espectrofotômetro Bioplus 2000 com leitura de comprimento de onda de 340nm e reação cinética contínua crescente.

4.7. Análises Histológicas

4.7.1. Análise Morfológica e Histoquímica do Fígado

Amostras do fígado foram destinadas ao estudo morfológico geral e análise histoquímica para evidenciação de inclusões lipídicas. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer -80°C. Foram

realizados cortes histológicos transversais semi-seriados de 5 μm de espessura com auxílio de criostato (Leica® CM1850). Os cortes foram banhados com formol cálcio Baker por 5 minutos, em seguida com álcool 70%, posteriormente um banho de água destilada e outro com água de torneira, para então descansar em Sudan III por uma hora. Após esta 1 hora, os cortes foram lavados com água destilada e água de torneira e corados com hematoxilina por 1 minuto e meio, seguido de uma lavagem de 5 minutos com água de torneira, finalizando a montagem com glicerol. Para estimar o percentual de inclusões lipídicas presentes no tecido hepático foi realizada captura de imagens em áreas com maior intensidade a reação histoquímica com objetiva de 40x (120 imagens/animal, perfazendo 600 imagens por tratamento) seguindo modelo cego de análise. Posteriormente foi realizada captura das imagens através de uma câmera digital de alta resolução Pro-Series da Media Cibertecnic[®], acoplada ao microscópio Olympus Bx 40[®]. Para leitura das imagens foi utilizado o programa Image Pro-Plus 4.1[®].

4.7.2. Análise morfológica e histológica do músculo

Amostras do músculo gastrocnêmio foram fixadas em formol tamponado, desidratados em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para realização de cortes histológicos semi seriados de 5 μm de espessura, corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE), para análise da morfologia geral dos tecidos. Foram verificadas a área de 100 fibras musculares por animal, totalizando 500 fibras por grupo experimental, seguindo o modelo cego de análise. Foi realizada captura das imagens através de uma câmera digital de alta resolução Pro-Series da Media Cibertecnic[®], acoplada ao microscópio Olympus Bx 40[®]. Para leitura das imagens foi utilizado o programa Image Pro-Plus 4.1[®].

4.8. Análise Estatística

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste *Shapiro Wilk*. As variáveis foram apresentadas em Média e erro padrão da média (EPM). Para comparações entre os grupos foi utilizado análise de variância ANOVA *Two-Way*, em caso do F apresentar significância estatística ($p < 0,05$) um *Post Hoc Tukey* foi aplicado. Foi utilizado o programa Graphpad Prisma versão 5.0.

5 RESULTADOS

Pode-se observar que o peso corporal das proles sofreu alteração em relação ao tipo da dieta utilizada, na qual os grupos controle (CS e CT) tratados com dieta padrão de ração apresentaram menor peso corporal em relação aos animais tratados com dieta de cafeteria (CaS e CaT). Quando analisamos os dados referentes ao Índice de Lee (parâmetro utilizado por alguns autores para determinar o grau de adiposidade em roedores) não observamos diferenças entre os grupos (tabela 4). A glicemia das proles CaT apresentaram valores estatisticamente maiores que CS.

Tabela 4. Peso corporal, índice de Lee e Glicemia das proles aos 21 dias.

	CS (n=7)	CT (n=7)	CaS (n=7)	CaT (n=7)
Peso corporal(g)	47,6 (1,1)	44,4 (0,9)	52,6 (0,7)*	54,9 (0,8)*
Índice de Lee	300,8 (2,7)	306,8 (1,8)	302,1 (1,5)	306,9 (2,2)
Glicemia (ml/dl)	114,9 (3,2)	119,7 (6,1)	118,9 (4,5)	139,7 (4.5) #

Valores expressam média \pm EPM de 7 animais por grupo, $P < 0,05$, * diferença significativa em relação aos animais controle, # diferença em relação a todos os grupo, Anova Two-way, Post Hoc Tukey.

Na tabela 5 verifica-se que o peso do fígado das proles do grupo CaT mostrou-se maior que o CT, quando os valores do peso do fígado foram corrigidos em g/100g peso corporal do animal, as proles do CS apresentaram valores maiores que o CaS.

Em relação aos valores de AST, que o grupo CT apresentou aumento em relação aos demais grupos (CS, CaS e CaT, $P < 0,05$). Para os dados da ALT observamos uma queda destes valores para os animais CaS e CaT em relação aos grupos CS e CT, o que leva a uma razão entre AST/ALT maior para estes grupos (CaS e CaT), em relação aos grupos controles (CS e CT). A atividade física não exerceu influência sobre este parâmetro em nenhuma das condições alimentares.

Tabela 5. Valores de peso do fígado em (g), peso do fígado corrigido (% peso corporal), e valores plasmáticos aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT) e razão entre AST/ALT das proles de 21 dias.

	CS (n=6)	CT (n=6)	CaS (n=6)	CaT (n=6)
Fígado (g)	1,73(0,04)	1,58(0,06)	1,70(0,04)	1,98(0,06)*
Fígado(%)	3,68(0,04)	3,55(0,09)	3,24(0,07)#	3,48(0,09)
AST (U/L)	38,4 (1,2)	54,0 (2,5) [‡]	42,5 (3,3)	35,2 (1,8)
ALT (U/L)	16,7 (1,2)	18,8 (2,0)	10,7 (0,8)\$	8,3 (0,9)\$
Razão AST-ALT	2,4 (0,2)	3,3 (0,3)	4,0 (0,2) #	5,1 (0,7) [‡]

Valores expressam média (EPM) de 6 animais por grupo, $P < 0,05$, * diferença significativa em relação aos animais controle treinado (CT), # diferença significativa em relação CS, ‡ diferença significativa em relação aos demais grupos, \$ diferença significativa em relação aos grupos controle.

Na figura 2 e 3 observamos a infiltração lipídica em proles de 21 dias cuja mãe permaneceu inativa (S) ou realizou exercício leve (T) na gestação e foram alimentadas com dieta controle (C) ou cafeteria (Ca) durante a gestação e lactação. Entre os animais sedentários não foram observadas diferenças significativas, porém a atividade física foi capaz de reduzir a infiltração lipídica hepática mesmo para o grupo cafeteria.

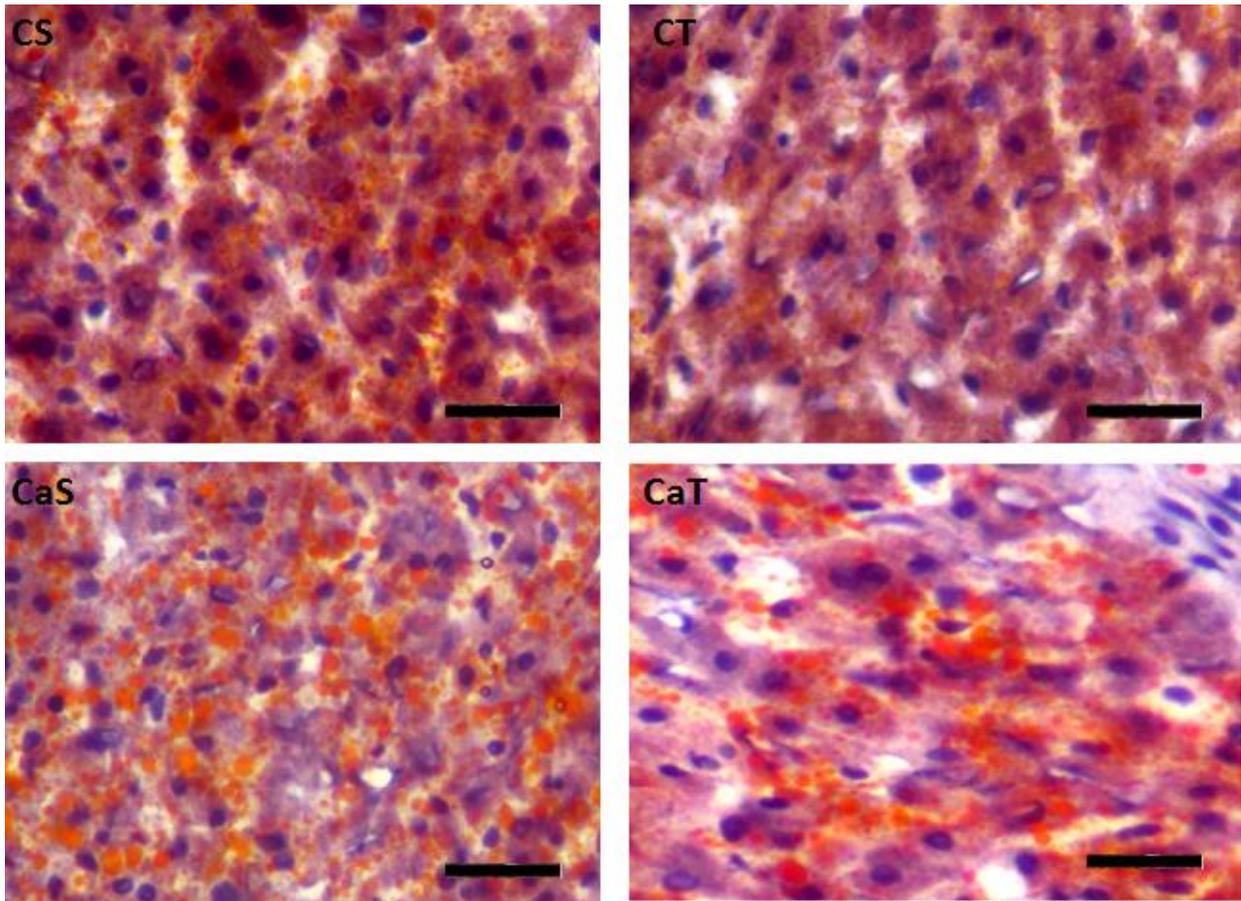


Figura 2. Fotomicrografia de fígado evidenciando inclusões lipídicas. Em A) filhote de ratas controles sedentária (CS), B) filhote de controle treinada (CT), C) filhote de cafeteria sedentária (CaS) e D) filhote de cafeteria treinada (CaT). Foi realizado a histoquímica através da técnica Sudam III, com cortes semi-seriados de 5 μ m, captura da imagem com objetiva 40x. Barra corresponde 50 μ m, n=5 animais por grupo.

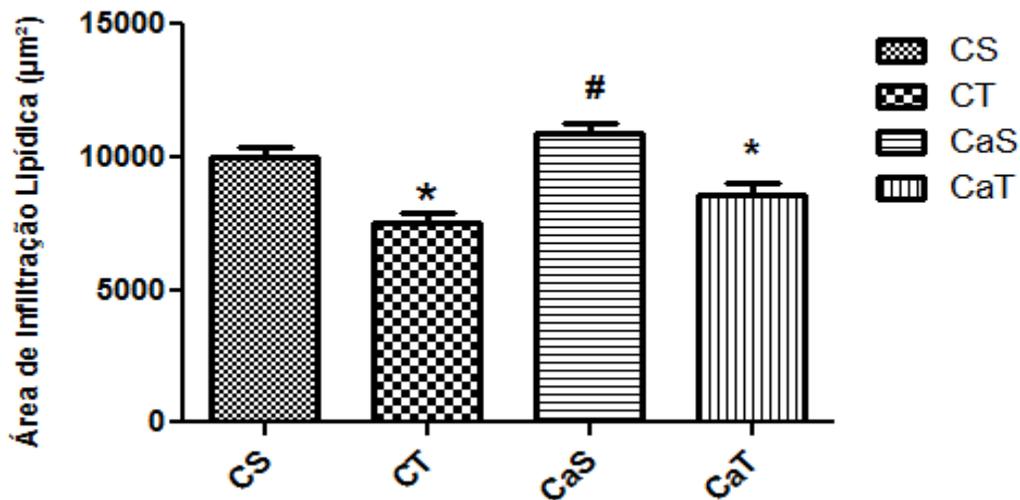


Figura 3. Área de infiltração lipídica das proles de mães controle sedentários (CS), controles treinados (CT), cafeteria sedentários (CaS) e cafeteria treinado (CaT). Valores expressam média \pm EPM de 5 animais por grupo, $P < 0,05$, * diferença significativa ao grupos sedentários, # em relação aos animais CT.

Quando avaliada a morfologia muscular, não foram encontradas diferenças significativas no peso do músculo gastrocnêmio em (g) ou mesmo corrigido pelo peso corporal dos animais, (tabela 6). Porém, houve na alteração enzima creatina cinase (CK), onde o exercício influenciou em ambas as dietas, uma vez que o grupo CT apresentou valores maiores que o CS, o mesmo o corre com o CaT comparado com o CaS.

Tabela 6. Valores de peso absoluto e relativo do gastrocnêmio, e creatina cinase (CK) das proles aos 21 dias.

	CS (n=6)	CT (n=6)	CaS (n=6)	CaT (n=6)
Peso gastrocnêmio (g)	0,20 ± 0.004	0,23± 0,02	0,24± 0,01	0,23±0,01
Peso gastrocnêmio (mg/100g)	0,42± 0,01	0,51± 0,04	0,45± 0,02	0,42±0,01
CK (u/L)	623,5± 140,5	634,4± 164,0*	438,0± 85,5	523,8±105,3*

Valores expressam média ± EPM de 5 animais por grupo, $P < 0,05$, * diferença significativa em relação aos animais sedentários.

Nas figuras 4 e 5 observamos uma fotomicrografia da área do músculo gastrocnêmio das proles dos diferentes grupos musculares e os valores das áreas musculares, respectivamente. Não foi observado diferenças significativas na morfologia entre os diferentes grupos experimentais..

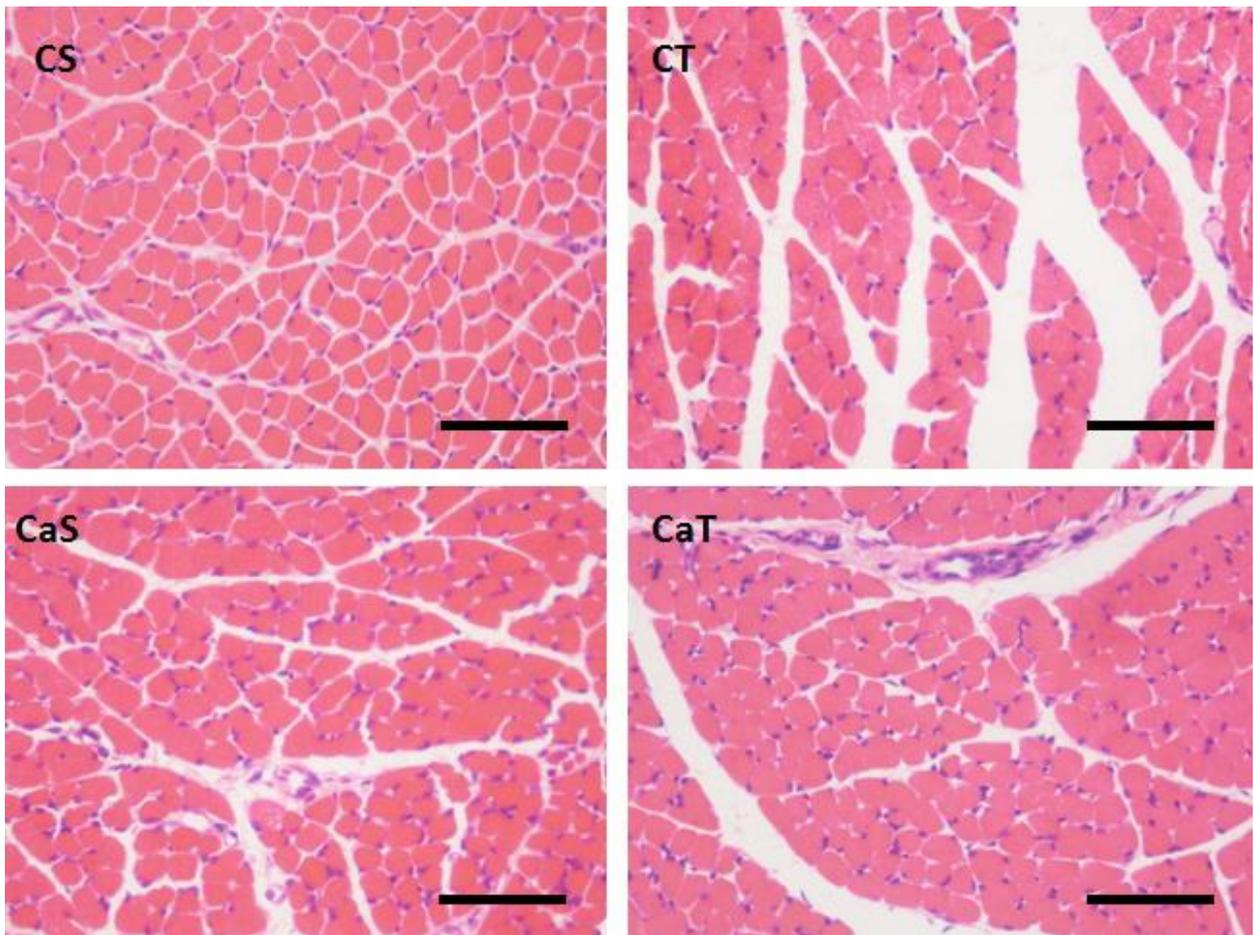


Figura 4 . Fotomicrografia da área da fibra muscular (μm^2) de proles de mães, sendo alimentadas com dieta padrão (C) ou dieta de cafeteria (Ca) que fizeram exercício (T) ou permaneceram sedentárias (S) durante a gestação durante a gestação e lactação. Foi realizado a histoquímica através da técnica H.E, com cortes semi- seriados de $5\mu\text{m}$, captura da imagem com objetiva 10x, analisados no programa Image Pro-Plus. Barra corresponde $300\mu\text{m}$.

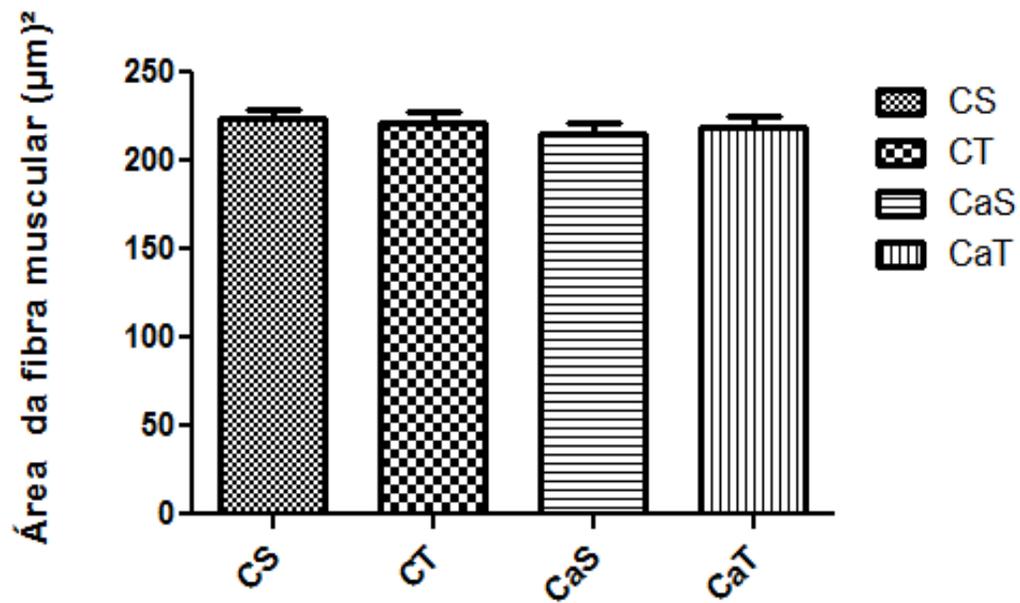


Figura 5. Área da fibra muscular do gastrocnêmio das proles aos 21 dias. CS controle sedentário, CT controle treinado, CaS cafeteria sedentário, CT cafeteria treinado. Valores expressam média \pm EPM de 5 animais por grupo.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho até onde conhecemos é o primeiro a associar atividade física aeróbia no período gestacional com dieta de cafeteria no mesmo período, para verificar o efeito do comportamento alimentar e o ambiente ativo das mães sobre a prole das ratas.

Vários estudos evidenciaram que somente a inserção da dieta de cafeteria nos períodos de gestação, lactação e desmame foram suficientes para desencadear prejuízos no desenvolvimento do músculo esquelético, causar uma predisposição ao excesso de peso, hiperglicemia, hiperleptinemia, acúmulo de lipídeo no músculo, desordens metabólicas relacionadas à resistência a insulina e o desenvolvimento de esteatose hepática (BAYOL et al., 2007; BAYOL et al., 2008; BAYOL et al., 2010). Estes dados corroboram com a hipótese de que nutrição é um dos fatores ambientais mais importantes que modula a expressão de genes envolvidos na via metabólica e a vários fenótipos associados com a obesidade e diabetes (MATHIAS et al., 2014).

Desse modo, verificamos que a dieta de cafeteria manipulada no período gestacional e lactacional, associado ou não a atividade física aeróbica, evidenciaram influenciar no peso corporal da prole, no qual os grupos provindos da cafeteria apresentaram valores significativamente maiores comparados com os controles. Demonstrando que após o desmame a dieta de cafeteria foi mais expressiva que a atividade física no controle do peso corporal das proles. Esses resultados são semelhantes a outros trabalhos no qual utilizaram este modelo de dieta e que a mesma demonstrou refletir um efeito negativo sobre o peso corporal, sobre tudo quando manipulado após o desmame até a vida adulta (KRETSCHMER et al., 2005; ALMEIDA, 2008; ESTEVES, 2012, MENDES et al., 2013). Confrontando com esses dados, outros estudos utilizaram este mesmo modelo de dieta durante a gestação e lactação e não obtiveram diferenças no peso corporal das proles ao desmame (BAYOL et al., 2005; HOLEMANS et al., 2004).

Estudos preliminares do nosso laboratório com dieta de cafeteria iniciadas em diferentes períodos, na gestação (ESTEVES, 2012), após o desmame (ALMEIDA,

2008), ou na fase adulta (PROENÇA, 2006), identificaram uma melhora na adiposidade, no perfil lipídico e normalização dos níveis de insulina, quando submetidos a um programa de treinamento físico aeróbio logo após o desmame, não sendo tão expressivo quando iniciado já na fase adulta.

Diante das evidências de que a dieta de cafeteria durante a gestação induz um quadro de desajustes metabólicos na prole, e que a atividade física mesmo após o nascimento mostrou-se eficiente a essas respostas, buscamos então verificar se a inserção do exercício físico durante a gestação poderia prevenir ou minimizar esses efeitos metabólicos deletérios da dieta de cafeteria sobre a prole.

Sendo assim, este estudo verificou se esse modelo de dieta durante a gestação e lactação associado a atividade física apresenta alguma interferência na suscetibilidade a NAFLD (esteatose hepática não alcoólica) e alteração no desenvolvimento muscular da prole logo ao desmame. Para tanto foi verificado o peso do fígado das proles, no qual foi estatisticamente maior no grupo cafeteria treinado (CaT) em relação ao controle treinado (CT), demonstrando uma maior impacto da dieta do que a atividade física nesse período, resultados semelhantes a estes foi encontrado por Bayol et al (2010), no qual mostrou que proles de mães alimentadas com cafeteria durante a gestação e lactação apresentaram um aumento de 20% do peso do fígado em relação as proles do grupo controle. Entretanto, ao analisar o peso relativo(%) do fígado corrigido mg/100 do peso corporal das proles, o grupo controle sedentário mostrou-se estatisticamente maior que o cafeteria sedentário.

A NAFLD, é uma patologia caracterizada por uma significativa deposição de lipídios nos hepatócitos do parênquima hepático, é por vezes associada com a função anormal do fígado através do teste de AST (TGO) e ALT (TGP) aumentados, por danos na célula e liberação para corrente sanguínea (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005; SASS et al., 2005).

No presente estudo, as enzimas AST e ALT sérica não foram boas indicadoras de esteatose hepática, como ocorre frequentemente em situações clínicas (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005), surpreendentemente os níveis de ALT, foram maiores nos grupos controle em relação a cafeteria, e o AST no grupo CT foi maior em relação aos demais grupos (CS,CaS e CaT), esses dados corroboram com outros

estudos os quais verificaram uma diminuição da ALT sérica de proles de mães alimentadas com cafeteria durante a gestação e lactação logo ao desmame comparada com as proles controle (BAYOL et al., 2010; FREITAS, 2011). Resultados contraditórios foram encontrados no estudo de Oben et al. (2010), cujas proles de mães que receberam dieta obesogênica durante a gestação e lactação apresentaram valores elevados da AST em comparação ao controle, além de apresentavam maior conteúdo de triglicérides no fígado, e um aumento na liberação de IL6 e TNF α citocinas indutoras de fibrogênese hepática. Porém, quando analisamos a Índice de Ritis para AST/ ALT os CaS e CaT os valores são maiores que os grupos CT e CS. A atividade física não exerceu influência sobre este parâmetro em nenhuma das condições alimentares.

Apesar dos dados descritos acima, ao avaliar a infiltração lipídica por meio da histoquímica, através do método Sudan III, observamos um padrão de alteração em relação a atividade física da mãe sobre a prole, em razão de que as proles do grupo CS apresentaram uma maior área de infiltração comparada ao CT, o mesmo ocorre com os CaS comparado o CaT. Esses dados sugerem que a atividade física realizada pela mãe durante a gestação foi eficaz para reduzir na prole o efeito deletério da dieta nesse órgão, mesmo num período relativamente precoce, aos 21 dias de nascimento.

Outro fator importante, também a ser investigado, são as alterações no desenvolvimento do músculo esquelético no período de pré-natal, uma vez que o mesmo não serve apenas para produzir movimento e força, mas também é um importante órgão metabólico responsável por 70% - 80% da glicose estimulada pela captação da insulina do corpo todo (DE FRONZO et al., 1981). Mas a influência de materna sobre o desenvolvimento do músculo esquelético ainda tem sido pouco investigado.

No presente trabalho foi analisado o peso do músculo gastrocnêmio, o qual não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais, demonstrando que a dieta de cafeteria associada a atividade física durante a gestação não interferiu nesta variável nesse período do desenvolvimento muscular, esse resultado se assemelha aos dados encontrados por Bayol et al. (2005), no qual verificou que somente a dieta de cafeteria durante a gestação e lactação não afetou o peso do músculo gastrocnêmio

logo ao desmame. Não possuímos uma resposta fisiológica conclusiva para tal resultado, porém ao desmame, as proles adquiriram cerca de um quarto do seu tamanho adulto e seus músculos são pequenos assim é possível que as alterações do peso dos músculos possam ser mais expressivos nos animais na idade adulta.

A área da fibra muscular do gastrocnêmio foi analisada nesse estudo logo após o desmame, não identificando diferenças entre os grupos. Apesar das mensurações estruturais ainda não apresentarem diferenças visíveis, foi possível observar alterações na funcionalidade muscular em decorrência das modificações verificadas nos valores de CK. Um outro estudo, utilizando apenas dieta de cafeteria durante a gestação e lactação, encontrou uma redução de 25% da área do músculo semitendinoso no grupo cafeteria comparado com o grupo controle (BAYOL et al., 2005). Em outros modelos de subnutrição materna durante a gestação também não gerou redução no número de fibras musculares (BAYOL et al., 2004).

Para nos assegurar que a dieta de cafeteria e atividade física durante a gestação induziu a influências no desenvolvimento do músculo esquelético, dosamos a enzima CK, que é amplamente utilizada como biomarcador de estresse e alteração na atividade muscular. A elevação sérica de CK é atribuída a danos teciduais, podendo resultar em aumento da permeabilidade da membrana celular, entre outros fatores, devido a peroxidação lipídica (HALSON, 2004). No caso de lesões teciduais, a enzima é liberada no líquido extra celular, aumentando sua atividade no soro (PRADA et al., 2005).

Os dados da enzima CK, apresentaram diferenças estatísticas nos grupos CT e CaT comparados com os CS e CaS, as proles dos grupos de mães que treinaram durante a gestação resultou no aumento da enzima CK, demonstrando que as diferentes dietas não interferiu fortemente na produção da enzima, entretanto a atividade física durante a gestação evidentemente gerou uma elevada liberação da CK.

O presente estudo apontou alguns avanços em relação a literatura atual, ao inserir a atividade física no período gestacional associado a dieta de cafeteria, contudo, algumas limitações podem ser apontadas. Dentre elas, a análise da composição do leite materno, bem como a expressão de marcadores moleculares envolvidos no

desenvolvimento muscular e na lesão hepática. Porém, mesmo com as limitações o presente estudo apresentou resultados que nos remete a novas investigações associando a atividade física na programação metabólica no período gestacional.

7 CONCLUSÃO

Os prejuízos a prole logo ao desmame causados pela dieta de cafeteria durante a gestação e lactação, se mostrou eficiente a induzir, no peso corporal e em marcadores de lesão hepática, visto nos resultados do Índice de Ritis de AST/ ALT. Em relação ao desenvolvimento muscular as alterações não foram expressivas nesse período, contudo acreditamos que se esse modelo experimental for trabalhado até a vida adulta poderíamos observar um padrão de alteração mais efetivo.

A atividade física inserida durante a gestação foi contundente para amenizar os efeitos deletérios da dieta na infiltração lipídica, uma vez que os grupos treinados resultaram em menores valores da área infiltrada comparada aos grupos controles logo ao desmame.

Mais estudos que investiguem o impacto da atividade física e o comportamento alimentar durante o período da gestação, verificando as alterações até a vida adulta das proles são necessárias para compreendermos melhor o impacto da programação metabólica em diferentes períodos da vida.

REFERÊNCIAS

Aksu B, Baykara SO. Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life. *Neuroscience Letters*. 2012; 516: 221-225.

Adans LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Mayo Clinic and College of Medicine*. 2005; 29: 899-905.

Almeida, F.N. Efeitos do treinamento físico aeróbio e do consumo da dieta de cafeteria após o desmame em características morfológicas e metabólicas apresentadas no fenótipo adulto de ratas wistar. 2008. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós –Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), 2008.

Ângulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent Predictors of Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 1999; 30: 1355-1362.

Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?. *J Physiol*. 2004; 561(2): 355–377.

Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol*. 2005; 565(1): 3–8.

Bayol SA, Simbi BH, Stickland NC. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *Journal Physiology*. 2005; 3: 951-961.

Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Journal of Nutrition, British*.2007; 98: 843-851.

Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *Journal Physiology*. 2008; 13: 3219-3230.

Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland, NC. A Maternal "Junk Food" Diet in Pregnancy and Lactation Promotes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Offspring. *Endocrinology*.2010; 15: 1451–1461.

Baker DJP. The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Padiatr Suppl*.1993; 391: 93-99.

Baker KB, Palekar NA, Bowers SP, Goldberg JE, Pulcini JP, Harrison SA. Non-Alcoholic Steatohepatitis: Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *American Journal of Gastroenterology*. 2006; 101: 368–373.

Bouchard,C. Atividade física e obesidade. São Paulo: Manole, 2003.

Cavalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização de insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(4): 419-425.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AN, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sayal AJ. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012; 55(6): 2005-2023.

Chan HLY, Silva HJ, Leung NWY, Lim S, Farrell GC. How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007; 22: 801–808.

Cesaretti MLR, Kolmann JrO. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 50(2): 190-197.

Correia MLG, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The Concept of Selective Leptin: Resistance Evidence From Agouti Yellow Obese Mice. *Diabetes*. 2002; 51: 439–442.

Choi K, Kim Y-B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010; 25(2): 19-29.

De Fronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. *Diabetes*. 1981; 30: 1000-1007.

Dela F, Handberg A, Mikines KJ, Vinten J, Gabo H. Glut 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. *Journal of Physiology*. 1993; 469: 615-624.

Enes CC, Slater B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2010; 13(1): 163-71.

Esteves, J. V. D. Efeito do treinamento físico e dieta alimentar sobre a adiposidade e resistência insulínica de prole macho de ratas submetidas a dieta de cafeteria. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física - UEM/UDEL, 2012.

Fiuza M. Esteatose hepática não-alcoólica - Um novo factor de risco cardiovascular?. *Fatores de Risco*. 2013; 29: 16- 19.

Franco JC, Fernandes TP, Rocha CDP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG, Trevenzoli IH. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J Physiol.* 2012; 590(21): 5503–5518.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, Boileau C, Rabes JP, Najib JF et al. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292: 1095–1100.

Guo SS, Chumlea WC. Tracking of body mass index in children in relation to overweight in adulthood. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70: 145–148.

Halson S, Jeukendrup A. Does overtraining exist? An analysis of overtraining research. *Sports Med.* 2004; 34: 967-981.

Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Assche FAV. Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2004; 190: 858-865.

Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *The Journal of Clinical Investigation.* 2000; 106(4): 459-465.

Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, Scholz H, Haus A. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences.* 2005; 76: 1553-1573.

Lall CG, Aisen AM, Bansal N, Sandrasegaran K. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *AJR* 2008; 190: 993–1002.

Li M, Sloboda DM, Vickhers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: Evidence from animal models. *Experimental Diabetes Research.* 2011; 1-9.

Luciano E, Carneiro ME, Carvalho CRO, Carvalheira JBC, Peres SB, Reis MAB et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *European Journal of Endocrinology*. 2002; 147: 149–157.

Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(4):177- 189.

Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez A. Aspectos genéticos da obesidade. *Revista de Nutrição*. 2004; 17(3): 327-338.

Mathias PC, Elmhiri G, Oliveira JC, Delayre-Orther C, Barella LF, Tófolo LP, Fabricio GS, Chango A, Abdennebi-Najar L. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr*. 2014 : 53:711–722.

Mendes FCV, Moreira BMT, Marsiglio GN, Carabelli B, Munhoz AC, Barella LF, Mareze-Costa CE, Gomes CRG. Dieta de cafeteria remodela a estrutura da aorta de ratos obesos. *Rev Saúde e Biol*. 2013; 8(1): 85-91.

Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2008; 9(3): 193-205.

Neuschwander- Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003; 37: 1202-1219.

Neuschwander- Tetri BA. Nonalcoholic Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2005; 330(6): 326–335.

Oben JA, Muralidarane A, Samuelsson A, Matteus PJ, Morgan ML, Mckee C, Novelli M, Poston L, Taylor PD. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the

development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Hepatology*. 2010; 52: 913–920.

Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, Guadagnini D, Cavalheira JBC, Saad MJA. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*. 2011; 60: 784-796.

Panve loski-Costa AC, Pinto Jr AC, Brandão BB, Moreira RJ, Machado UF, Seraphim PM. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011; 55(2): 155-163.

Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(4): 399-408.

Prada PO, Zecchin HG, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE et al. Western Diet Modulates Insulin Signaling, c-Jun N-Terminal Kinase Activity, and Insulin Receptor Substrate-1ser307 Phosphorylation in a Tissue-Specific Fashion. *Endocrinology*. 2005; 146(3): 1576–1587.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 106(7): 165-169.

Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales ON. Diabetes in Old Male Offspring of Rat Dams Fed a Reduced Protein Diet. *Int. Jnl. Experimental Diab. Res*. 2001; 2: 139-143.

Proença, A. R.G. Influência do treinamento físico sob a massa adiposa e resposta glicêmica de animais submetidos a dieta de cafeteria. 2006. Trabalho de conclusão de

Curso apresentada ao Departamento de Educação Física da Universidade Estadual de Maringá, 2006.

Reid AE, Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2001; 121:710–723.

Regô C. Da responsabilidade profissional à responsabilidade social ou o que o pediatra deve conhecer sobre obesidade e programação metabólica. *Acta Pediatr Port*. 2011; 42(6): 98-99.

Reaven G. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-1607.

Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Review. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005; 50(1): 171-180.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabetic Medicine*. 2005; 22: 674–682.

Schenk S, Horowitz JF. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid–induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 1690–1698.

Silva RG, Mello MAR. Efeitos da ingestão de dieta hipoprotéica e de Exercício físico moderado sobre a evolução da gestação e o desenvolvimento fetal em ratas jovens. *Revista Paulista de Educação Física*. 2000; 14(2): 118-127.

Shulman G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000; 106(7): 171-176.

Taylor PD, Khan IY, Hanson MA, Poston L. Impaired EDHF-mediated vasodilatation in adult offspring of rats exposed to a fat-rich diet in pregnancy. *J Physiol*. 2004; 558(3): 943–951.

Taylor PD, Khan IY, Lakasing L, Dekou V, Brien-Coker I, Mallet AI et al. Uterine artery function in pregnant rats fed a diet supplemented with animal lard. *Experimental Physiology*. 2003; 88(3): 389–398.

Thyfaut JP, Cree MG, Zeng D, Zwetsloot JJ, Tapscott EB, Koves TR et al. Contraction of insulin-resistant muscle normalizes insulin action in association with increased mitochondrial activity and fatty acid catabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(10): 729–739.

Tucortte LP, Fisher JS. Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise. *Physical Therapy*. 2008; 88: 1279-1296.

Utzschneider KM, Kahn SE. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(12): 4753–4761.

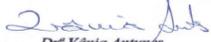
Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279: 83-87.

World Health Organization. 2012.

Zhang J, Wang C, Terroni PL, Cagampang FRA, Hanson M, Byrne CD. High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: 112–118.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação.

 Universidade Estadual de Maringá Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação			
Parecer emitido após reunião realizada em: 9 /11/2010		Parecer nº 113/2010	
Pesquisador: Solange Marta Franzói de Moraes		Setor: DFS	
Título:		Protocolo nº 022/2010	
Treinamento físico e dieta alimentar: efeitos sobre a resistência a insulina e adiposidade em diferentes fases do desenvolvimento			
Entrada: 27/5/2010	Início: 15/5/2010	Término: 14/5/2013	
Situação do Projeto:	Aprovado		
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto		
ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.			
Considerações e Parecer: Considerando que todos os questionamentos foram devidamente respondidos, conforme constam nas fls. 71 a 73 do presente protocolo, somos de parecer que se aprove o mesmo. Contudo, solicita-se ainda à Coordenadora que informe no relatório final qual a metodologia de eutanásia que será utilizada tanto nos ratos filhotes fêmeas, quanto nos ratos filhotes machos excedentes que não serão aproveitados na experimentação e o destino final de tais animais. Orienta-se ainda à secretaria do Comitê que se junte o protocolizado 10969/2010-PRO ao Processo 022/2010-CEAE.			
 Dr. ^a Vânia Antunes Presidente do CEAE/UEM			
Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias: I - aprovado; II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto; III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação; IV - não aprovado			
www.ppg.uem.br - e-mail: ceea@uem.br			

