

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

MANUELA MENEGOTTO ZEFERINO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROADAPTATIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO SOBRE A PROLE DE RATAS SUBMETIDA A UMA DIETA
OBESOGÊNICA: FOCO NA EXPRESSÃO GÊNICA MITOCONDRIAL**

PORTO ALEGRE

2023

MANUELA MENEGOTTO ZEFERINO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROADAPTATIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO SOBRE A PROLE DE RATAS SUBMETIDA A UMA DIETA
OBESOGÊNICA: FOCO NA EXPRESSÃO GÊNICA MITOCONDRIAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, departamento de Nutrição, Faculdade de Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Matté

Coorientadora: Dra. Daiani Vargas

PORTO ALEGRE

2023

MANUELA MENEGOTTO ZEFERINO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROADAPTATIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO SOBRE A PROLE DE RATAS SUBMETIDA A UMA DIETA
OBESOGÊNICA: FOCO NA EXPRESSÃO GÊNICA MITOCONDRIAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, departamento de Nutrição, Faculdade de Medicina.

Porto Alegre, 10 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Juliana Rombaldi Bernardi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Cristiane Matté - Orientadora

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Zeferino, Manuela Menegotto
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROADAPTATIVOS DO
EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO SOBRE A PROLE DE RATAS
SUBMETIDA A UMA DIETA OBESOGÊNICA: FOCO NA EXPRESSÃO
GÊNICA MITOCONDRIAL / Manuela Menegotto Zeferino. --
2023.

38 f.

Orientadora: Cristiane Matté.

Coorientadora: Daiani Vargas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de
Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. DOHaD. 2. Exercício Materno. 3. Dieta
Obesogênica. 4. Mitocôndria. 5. Cerebelo. I. Matté,
Cristiane, orient. II. Vargas, Daiani, coorient. III.
Titulo.

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura corporal, e tem sido associada com o aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). O consumo excessivo de alimentos com alta densidade energética atrelado ao sedentarismo impactam no desenvolvimento da obesidade. Nesse contexto, o exercício físico é reconhecido como uma estratégia protetora, visto que está associado a redução do risco de desenvolver DCNTs. A programação metabólica gestacional define-se pelo conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD), que prevê que as condições intrauterinas impactam no desenvolvimento da saúde e no risco de desenvolver DCNT na vida adulta. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do exercício gestacional sobre a expressão de mRNA de genes relacionados à biogênese e à dinâmica mitocondrial no cerebelo da prole submetida à obesidade por meio de dieta na vida adulta. Para tal, ratas Wistar foram submetidas a 5 sessões semanais de 30 minutos de natação durante toda a gestação. Após o desmame, a prole recebeu dieta padrão ou dieta obesogênica (alto teor de gordura e sacarose). No dia pós-natal (DPN) 90, os animais foram eutanasiados e o cerebelo foi coletado. A expressão dos genes mitocondriais PGC1 α , TFAM e MFN1 foi avaliada através de RT-qPCR utilizando TUBA1B e GAPDH como genes normalizadores. Não foram observadas alterações na biogênese mitocondrial por meio da expressão de PGC1 α e TFAM. A dinâmica mitocondrial foi alterada por um aumento na expressão de MFN1 em resposta ao exercício físico materno associado à dieta obesogênica na prole feminina. O gene GAPDH, inicialmente incorporado ao estudo como um normalizador, apresentou aumento em sua expressão em resposta ao exercício físico, à dieta obesogênica na prole e a ambos fatores associados na prole masculina. Os resultados sugerem que o exercício materno durante a gestação apresenta efeitos neuroadaptativos sobre a expressão gênica mitocondrial da prole submetida à obesidade por meio de dieta em idade adulta, de maneira sexo-dependente.

Palavras-chave: DOHaD; Exercício Materno; Dieta Obesogênica; Mitocôndria; Cerebelo; Prole.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease characterized by an excessive body fat, and has been associated with an increase in chronic non-communicable diseases (CNCDs). Excessive consumption of foods with high energy density combined with a sedentary lifestyle have an impact on the development of obesity. In this context, physical exercise is recognized as a protective strategy, as it is associated with a reduced risk of developing CNCDs. Gestational metabolic programming is defined by the concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), which says that intrauterine conditions impact the development of health and disease in adult life. Our objective was to evaluate the effects of gestational exercise on mRNA expression of genes related to biogenesis and mitochondrial dynamics in the cerebellum of offspring submitted to obesity through diet. For this purpose, Wistar rats were submitted to 5 weekly sessions of 30 minutes of swimming during the entire pregnancy. After weaning, the offspring received a standard diet or an obesogenic diet (high in fat and sucrose). On postnatal day (PND) 90, the animals were euthanized and the cerebellum was collected. The expression of mitochondrial genes PGC1 α , TFAM and MFN1 was evaluated by RT-qPCR, using TUBA1B and GAPDH as reference genes. No changes were observed in mitochondrial biogenesis through expression of PGC1 α and TFAM. Mitochondrial dynamics were altered by an increase in MFN1 expression in response to maternal physical exercise associated with an obesogenic diet in female offspring. The GAPDH gene, initially incorporated into the study as a normalizer, showed an increase in its expression in response to physical exercise, an obesogenic diet in the offspring and both associated in the male offspring. The results suggest that maternal exercise during pregnancy has neuroadaptive effects on mitochondrial gene expression in offspring submitted to obesity through diet in adulthood, in a sex-dependent manner.

Keywords: DOHaD; Maternal Exercise; Obesogenic Diet; Mitochondria; Cerebellum; Offspring.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTE – Cadeia de transporte de elétrons

DCNTs – Doenças crônicas não transmissíveis

DG – Dia gestacional

DOHaD – Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do inglês: *Developmental Origins of Health and Disease*)

DPN – Dia pós-natal

DRP1 – Proteína relacionada à dinamina 1

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HFS – Dieta rica em gordura e açúcar (do inglês: *High Fat Sugar*)

MFN1 – Mitofusina 1

MFN2 – Mitofusina 2

NRF-1 – Fator respiratório nuclear 1

NRF-2 – Fator respiratório nuclear 2

OPA1 – Proteína de atrofia óptica 1

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGC1 α – Proliferador de peroxissomo- γ coativador-1 α

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real

RT – Transcrição reversa

SIRT3 – Sirtuína 3

TFAM – Fator de transcrição mitocondrial A

TUBA1B – Tubulina Alfa 1b

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 OBESIDADE	10
2.2 DOHaD.....	11
2.3 EXERCÍCIO MATERNO.....	12
2.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	13
3. JUSTIFICATIVA	15
4. OBJETIVO	15
4.1 OBJETIVO GERAL	15
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	15
5.2 ANIMAIS	16
5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	16
5.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO MATERNO.....	17
5.5 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA	17
5.6 REAGENTES	18
5.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	19
5.7.1 RT-qPCR.....	19
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
6. REFERÊNCIAS.....	20
7. ANEXOS	26

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizada em 2019, que divulgou informações antropométricas da população brasileira, a prevalência de excesso peso para os adolescentes de 15 a 17 anos de idade foi 19,4%, correspondendo a aproximadamente 1,8 milhão de pessoas. Já a prevalência de obesidade foi 6,7%, sendo maior entre adolescentes do sexo feminino (8%) comparado ao sexo masculino (5,4%). Entre a população adulta, a prevalência de excesso de peso foi 60,3%, o que corresponde a aproximadamente 96 milhões de pessoas. Já a prevalência de obesidade foi 25,9%, também sendo maior entre as mulheres (29,5%) quando comparado aos homens (21,8%) (IBGE, 2020). O desenvolvimento da obesidade relaciona-se com uma ingestão calórica aumentada atrelada a uma diminuição do gasto energético provocada pelo sedentarismo. Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde pública, tendo em vista que está associada a um aumento da prevalência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e resistência periférica à insulina. Por isso, sua prevenção e tratamento apresentam um papel essencial para a promoção de saúde (DE LORENZO et al., 2019; SCHMITT e GASPAR, 2023). É importante ressaltar a contribuição do ambiente no aumento da obesidade nas últimas décadas. O aumento da ingestão de alimentos com alta densidade calórica está relacionado com uma “dieta ocidental”, caracterizada por alimentos processados, ricos em açúcar e gordura, e pobres em fibras. Além disso, o mundo moderno caracterizado pela mecanização e automação impactou na redução das atividades físicas no dia-a-dia. Comportamentos sedentários como jornadas de trabalho com tarefas somente no computador e atividades de lazer envolvendo o uso de telas como televisão, computador e celular influenciam diretamente na redução do gasto energético (WESTBURY et al., 2023).

O exercício físico tem sido reconhecido como uma alternativa não farmacológica para a prevenção de doenças, visto que está associado com uma redução da incidência de DCNTs (STEFANI e GALANTI, 2017). Ademais, a prática de exercício é recomendada durante o período gestacional, uma vez que está associada à redução do risco de doenças como diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (ARTAL, 2016). A área da biologia que investiga as origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, conhecida pelo termo em inglês *Developmental Origins of Health and Disease*

(DOHaD), preconiza que a saúde e a doença na vida adulta são influenciadas por experiências que ocorreram durante o período intrauterino e a primeira infância (LINNÉR e ALMGREN, 2020). Nesse sentido, a pesquisa na área DOHaD possibilita o reconhecimento de fatores que podem afetar a saúde e a doença dos indivíduos ao longo da vida, tanto de maneira positiva, quanto negativa (PENKLER et al., 2019).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021) define a obesidade como uma doença multifatorial caracterizada por um excesso de adiposidade. Entre 1980 e 2013, a prevalência mundial de sobrepeso e obesidade aumentou 27,5% em adultos e 47,1% em crianças (NG et al., 2014). Atualmente, aproximadamente 40% da população mundial está acima do peso. Estima-se que um a cada cinco adultos tenham obesidade até 2025 (WHO, 2021). O aumento no consumo de alimentos com alta densidade energética, o sedentarismo e as mudanças no microbioma intestinal são alguns dos possíveis fatores que elucidam o expressivo aumento da obesidade nos últimos anos (NG et al., 2014). Estudos demonstram que dietas ricas em gorduras não só induzem a obesidade em humanos, mas também em animais (HARIRI e THIBAUT, 2010). O sobrepeso e a obesidade aumentam o risco de desenvolver DCNTs, como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão e dislipidemia (DE LORENZO et al., 2019). Essas condições estão associadas às principais causas de morte no Brasil, configurando um problema de saúde que afeta significativamente a população (MARTINS, 2018).

A obesidade promove um estado de inflamação sistêmica que se desenvolve a partir do armazenamento excessivo de nutrientes nos adipócitos, levando a sua hipertrofia (SOLTANI et al., 2020). Ademais, é descrito que ocorre um comprometimento da biogênese e função mitocondrial, resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam os tecidos e favorecem o desenvolvimento de DCNTs (ARDID-RUIZ et al., 2018; SOLTANI et al., 2020). Tendo isso em vista, o ambiente metabólico na fase intrauterina e durante os dois primeiros anos de vida, que são impactados pela nutrição e estilo de vida da mãe, além da alimentação e estilo de vida pós-natal, contribui para a saúde da prole, podendo

predispor o desenvolvimento de obesidade na vida adulta (RAJAMOORTHI et al., 2022).

2.2 DOHaD

Historicamente, a programação metabólica, também conhecida como hipótese de Barker, correlaciona o ambiente adverso intrauterino com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo II na vida adulta (HALES e BARKER, 1992). Nas últimas décadas, a linha de pesquisa DOHaD tem sugerido uma associação entre intervenções nos primeiros 1000 dias de vida, que compreendem desde a concepção até 2 anos após o nascimento, e o aparecimento de DCNTs no decorrer da vida (SUZUKI, 2017). A partir disso, o conceito de DOHaD abriu espaço para um campo de estudos que têm como objetivo relacionar as interferências ambientais durante o desenvolvimento e os desfechos metabólicos em longo prazo (SILVEIRA et al., 2007).

O período de desenvolvimento pré-natal é marcado pela capacidade do feto de responder às condições adversas intrauterinas e adaptar seu metabolismo, devido à sua alta plasticidade metabólica (GLUCKMAN et al., 2011). Essas adaptações ocorrem a partir de modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA, a modificação de histonas e as ações de microRNAs, que ativam ou silenciam genes sem alterar a sequência do DNA. Nesse sentido, ocorre uma modificação na regulação da expressão gênica que resulta em alterações fenotípicas. Ademais, essas alterações podem ser transmitidas entre gerações (CAROLAN-OLAH et al., 2015). A gestação é um período crítico na programação do neurodesenvolvimento, por isso o cérebro parece ser particularmente afetado, apesar do desenvolvimento encefálico não encerrar durante a gestação (BALE, 2015; CLANCY et al., 2007).

Dados obtidos de estudos epidemiológicos contribuíram para embasar a hipótese de DOHaD. Um estudo conduzido por Barker e colaboradores (1989) demonstrou associação entre baixo peso ao nascer e maiores riscos de mortalidade por doença coronariana em homens nascidos em Hertfordshire (Inglaterra) entre 1911 e 1930. Para melhor compreender as correlações e mecanismos observadas em populações humanas, o uso de modelos animais tem sido fundamental (MCMULLEN e MOSTYN, 2009). As espécies mais utilizadas são os roedores, como ratos e camundongos, visto que esses modelos oferecem como vantagens o curto tempo de gestação e de vida, possibilitando estudos ao longo da vida e nas gerações seguintes,

além de custos relativamente baixos (HSU e TAIN, 2021; MCMULLEN e MOSTYN, 2009). Dessa forma, os modelos animais são essenciais para compreender os mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento da saúde e da doença e promover o desenvolvimento de intervenções para posteriormente implementá-las em humanos (CHAVATTE-PALMER et al., 2016).

2.3 EXERCÍCIO MATERNO

O exercício físico é indicado em todas as fases da vida, incluindo o período gestacional. Recomenda-se, pelo menos, 150 minutos de atividade física semanal de intensidade moderada para mulheres grávidas que não apresentam nenhum tipo de complicação na gestação (ACOG, 2020). A prática de exercícios físicos durante a gravidez é considerada segura tanto para a mãe quanto para o feto. Ademais, diversos benefícios maternos já foram elucidados em humanos, como menor incidência de ganho de peso gestacional excessivo, diabetes gestacional e distúrbios hipertensivos (ACOG, 2020; KUSUYAMA et al., 2020). Os efeitos do exercício materno sobre a saúde da prole também vêm sendo investigados. Estudos em humanos demonstraram que o exercício durante a gestação diminuiu o risco de obesidade nos filhos no início da vida (KUSUYAMA et al., 2020). Entretanto, os efeitos na saúde da prole até a idade adulta não são frequentemente avaliados em humanos, visto que o longo tempo de desenvolvimento dificulta a investigação dos efeitos do exercício a longo prazo. A partir disso, os modelos animais têm sido utilizados para investigar as implicações do exercício físico materno durante a gestação na saúde metabólica da prole em idade adulta (HARRIS et al., 2018). Estudos elucidaram diversos efeitos positivos na prole, como a melhora no metabolismo da glicose (HARRIS et al., 2018; STANFORD et al., 2017; WASINSKI et al., 2015), o aumento da sensibilidade à insulina (CARTER et al., 2013; STANFORD et al., 2015), a melhora da capacidade antioxidante cerebral (MARCELINO et al., 2013), bem como a melhora da memória da prole, que persiste até a vida adulta do animal (FIDALGO et al., 2013; KIM et al., 2007; MARCELINO et al., 2016; ROBINSON e BUCCI, 2014). Também foi demonstrado que o exercício de natação durante a gestação promove melhora da função mitocondrial, evidenciado por aumento na massa mitocondrial e potencial de membrana, ativação da α -cetoglutarato-desidrogenase e da citocromo-c-oxidase, bem como modulação da dinâmica mitocondrial via MFN1 e DRP1 na prole (KLEIN et al., 2018). Um dos aspectos intrigantes é o efeito sexo-dependente de muitas

intervenções pré-natais, o que exige a ampliação dos estudos de programação metabólica para ambos os sexos (BALE e EPPERSON, 2017).

Atualmente, busca-se entender quais são os mecanismos celulares pelos quais o exercício físico exerce seus efeitos benéficos. Dados da literatura sugerem que o exercício impacta em alterações no metabolismo e na dinâmica mitocondrial. Durante o exercício ocorre um aumento na produção de EROs, que têm como principal fonte a mitocôndria. Essas EROs medeiam os efeitos adaptativos do exercício a partir da ativação de vias de sinalização celulares, como MAPK, PGC-1 α , Nrf2, NF κ B, dentre outras, resultando no aumento das defesas antioxidantes e no número de mitocôndrias (HE et al., 2016; RADAK et al., 2007; RADAK et al., 2005, RADAK et al., 2008). Nesse sentido, essas vias de sinalização podem induzir genes com importantes funções cerebrais. Recentemente, Wrann e colaboradores (2015) mostraram que os níveis de BDNF hipocámpais são aumentados pelo exercício aeróbico via ativação do PGC-1 α , o qual induz a expressão de FNDC5, e esse de BDNF.

2.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são organelas multifuncionais que desempenham diversas funções, como regulação bioenergética, sinalização celular e apoptose (KHACHO et al., 2019; SCARPULLA et al., 2012). Estruturalmente, as mitocôndrias são formadas por uma membrana dupla, com uma membrana externa voltada para o citosol e uma membrana interna com invaginações, conhecidas como cristas, projetadas na matriz mitocondrial (CHAKRABARTY e CHANDEL, 2022). Localizam-se nas cristas os complexos proteicos que formam a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e a ATP sintase mitocondrial, essenciais para a geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa, consistindo na via celular mais eficiente para síntese de ATP (ESTERAS e ABRAMOV, 2022). A mitocôndria é um centro metabólico fundamental para a produção de energia. Diferentes vias metabólicas derivadas da oxidação de macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) convergem para as mitocôndrias (ESTERAS e ABRAMOV, 2022). Na matriz mitocondrial de células eucarióticas ocorre o ciclo do ácido cítrico, também conhecido como ciclo de Krebs, que oxida piruvato derivado da glicólise, ácidos graxos e aminoácidos e gera intermediários metabólicos e equivalentes redutores (NADH.H⁺ e FADH₂). A partir disso, os equivalentes redutores transferem elétrons para a CTE, criando um fluxo de elétrons que promove o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, gerando um

gradiente eletroquímico necessário para produzir ATP por meio da fosforilação oxidativa (CHAKRABARTY e CHANDEL, 2022).

A preservação da função mitocondrial é essencial para a viabilidade das células eucarióticas ao longo da vida. Por isso, diferentes processos estão envolvidos na manutenção da saúde mitocondrial, como a biogênese mitocondrial, degradação de mitocôndrias danificadas e dinâmica mitocondrial, que contempla os processos de fusão e fissão (CHAKRABARTY e CHANDEL, 2022; KHACHO et al., 2019). A biogênese mitocondrial é a geração de novas mitocôndrias através da replicação e crescimento de mitocôndrias já existentes. Alguns estímulos, como a regulação termogênica e o exercício físico, induzem a expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomo- γ coativador-1 α (PGC-1 α), que é o principal regulador da biogênese mitocondrial. O PGC-1 α promove a ativação dos fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), levando a expressão de proteínas mitocondriais necessárias para a replicação do DNA mitocondrial (mtDNA), como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que se liga a região promotora e permite o recrutamento da RNA polimerase mitocondrial, iniciando o processo de replicação (CARDANHO-RAMOS e MORAIS, 2021). A dinâmica mitocondrial consiste em dois mecanismos opostos: a fusão, caracterizada pela união de duas mitocôndrias em uma, e a fissão, caracterizada pela divisão de uma mitocôndria em duas. A fusão mitocondrial é regulada por proteínas pertencentes à família das GTPases, as mitofusina 1 (MFN1) e mitofusina 2 (MFN2), localizadas na membrana mitocondrial externa, e a proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), localizada na membrana mitocondrial interna. A fissão mitocondrial é realizada principalmente pela proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1) citosólica, que se transloca para a membrana mitocondrial externa, onde se liga aos seus receptores para induzir a fissão. O local onde é realizada a fissão é marcado pelo contato da mitocôndria com o retículo endoplasmático, que desempenha um papel essencial nesse processo (COLLIER et al., 2023; GIACOMELLO et al., 2020). A desregulação da função mitocondrial tem amplas implicações para doenças humanas, incluindo diabetes, insuficiência cardíaca e neurodegeneração (SCARPULLA et al., 2012). A partir disso, o equilíbrio adequado entre os processos de fissão e fusão é essencial para garantir uma homeostase mitocondrial.

3. JUSTIFICATIVA

De acordo com a literatura, o sobrepeso e a obesidade estão associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de DCNTs, o que impacta diretamente na saúde pública. Considerando que o exercício físico é reconhecido como uma estratégia protetora contra diversas condições patológicas, buscamos avaliar os efeitos de longo prazo e transgeracionais do exercício materno durante o período gestacional sobre o metabolismo mitocondrial e a prevenção da obesidade na prole de ratas Wistar.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos neuroadaptativos do exercício físico materno durante a gestação sobre a expressão gênica mitocondrial da prole submetida a uma dieta obesogênica na idade adulta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Delimitar alterações na expressão de mRNA de genes relacionados à biogênese e à dinâmica mitocondrial no cerebelo da prole adulta (dia pós-natal 90) submetida a obesidade por meio de dieta, através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), visto que os mecanismos epigenéticos têm como alvo primário a transcrição. Foram selecionados os seguintes genes mitocondriais: PGC1 α , TFAM e MFN1. Além disso foram utilizados como genes normalizadores: Tubulina alfa 1b (TUBA1B) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo animais seguiram as diretrizes da Lei Federal nº 11.794/08, que dispõe sobre as condições de criação e uso de animais para ensino e pesquisa científica, e as Diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle De Experimentação Animal), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS). O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da

Saúde/UFRGS (COMPESQ/ICBS/UFRGS) e da CEUA/UFRGS, sendo aprovado sob o número 39441.

5.2 ANIMAIS

Para a execução desse projeto de pesquisa foram utilizados ratos Wistar adultos machos e fêmeas (120 dias de vida), além dos filhotes provenientes. Os animais foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS – Porto Alegre/Brasil e alojados no biotério setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, sendo mantidos em ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com acesso a alimento e água *ad libitum*. Após o nascimento, a prole foi mantida com a mãe em caixa individual (41 x 34 x 16 cm) forrada com maravalha até o desmame (dia pós-natal 21). Após o desmame, os animais de mesmo sexo foram mantidos em caixas separadas de suas mães, com no máximo quatro filhotes por caixa.

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As ratas fêmeas adultas foram inicialmente divididas em 2 grupos: 1) controle sedentário e 2) exercício de natação. Para adaptação ao ambiente aquático, o exercício de natação teve início 1 semana antes do acasalamento e seguiu durante todo o período de prenhez. Para o acasalamento, os ratos Wistar machos foram colocados em contato com as fêmeas por um período de 48h (2 fêmeas:1 macho). A gravidez foi diagnosticada através da presença de espermatozoides em lavado vaginal (AKHAVAN et al., 2008). O lavado vaginal foi realizado uma vez ao dia, no período da manhã entre 8h e 10h, iniciado no dia posterior à alocação das ratas na caixa com o macho para acasalamento. Os animais foram levados para a sala experimental, onde a secreção vaginal foi coletada após a inserção da ponta de uma pipeta de plástico preenchida com 100 μL de soro fisiológico, que foi eluído e depois aspirado. O lavado vaginal resultante foi colocado sobre lâmina de vidro e analisado em microscopia ótica. O dia em que foram encontrados espermatozoides no lavado vaginal foi considerado o dia gestacional zero (DG0). As ratas gestantes foram mantidas em grupos de 3 animais por caixa (41 x 34 x 16cm) até o DG20, quando foram acomodadas individualmente para o parto e observadas pela manhã e pela tarde até o nascimento dos filhotes. O dia correspondente ao nascimento da prole foi definido como dia pós-natal zero (DPN0). As ninhadas foram padronizadas em 8

filhotes (4 machos e 4 fêmeas) e permaneceram com a mãe até o dia de desmame (DPN21), sendo posteriormente mantidos em grupos de 4 animais por caixa, separados por sexo, até o final do experimento. Os animais excedentes foram eutanasiados com sobredose anestésica (isoflurano, 4-5% em 500 mL O₂), seguida de decapitação por guilhotina para confirmar a morte do animal. A eutanásia dos neonatos foi realizada utilizando-se uma tesoura afiada. Os animais foram alocados em suas caixas em sala anexa até o momento em que foram levados à sala de eutanásia para realização do procedimento. A guilhotina utilizada é construída para a eutanásia de roedores, afiada e com manutenção adequada. Os alunos que realizaram esse procedimento têm treinamento para a realização da eutanásia em guilhotina.

5.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO MATERNO

O protocolo de exercício físico ao qual foram submetidos os animais foi previamente desenvolvido em nosso laboratório (MARCELINO et al., 2013), tendo sido adaptado de modelos descritos na literatura (AKHAVAN et al., 2008; LEE et al., 2006). O aparato consiste em um tanque com 90 cm de altura e 30 cm de diâmetro, que foi preenchido com água à 32 °C a uma profundidade de 60 cm. As ratas foram divididas em 2 grupos: 1) controle sedentário e 2) exercício de natação. O protocolo de natação iniciou 1 semana antes do acasalamento e seguiu durante toda a prenhez, sendo realizado 5 vezes/semana, durante um período de 30 minutos/dia (Figura 1A). Após a natação, os animais foram gentilmente retirados do tanque e secos com toalha macia antes de retornar à caixa moradia. O grupo controle também foi submetido ao ambiente aquático, as ratas foram colocadas no aquário e imediatamente retiradas, secas e acomodadas em sua caixa moradia.

5.5 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA

A prole dos diferentes grupos maternos foi subdividida em 4 grupos: 1) controle, 2) exercício materno, 3) dieta obesogênica e 4) exercício materno + dieta obesogênica (Tabela 1). Os animais pertencentes aos grupos 1 e 2 receberam dieta padrão do biotério (20,8% de proteínas, 9,4% de lipídios e 69,8% de carboidratos) *ad libitum*. Os animais pertencentes aos grupos 3 e 4 receberam dieta com alto teor de gordura associada a uma solução de sacarose (14,8% de proteínas, 58,7% de lipídios e 26,5% de carboidratos) *ad libitum*, do DPN21 ao DPN90 (Figura 1B). Os animais foram

pesados semanalmente. No DPN90, foram eutanasiados após jejum de 12 horas por decapitação em guilhotina. Amostras de cerebelo foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios. Tendo em vista que o uso de anestésicos pode levar a alterações bioquímicas (RIGOULET et al., 1996; VENÂNCIO et al., 2015), os animais utilizados no projeto foram eutanasiados sem o uso de anestésico como forma de prevenir quaisquer alterações que possam afetar os resultados provenientes do estudo.

Tabela 1: Grupos experimentais e suas respectivas variáveis experimentais.

Grupos	Exercício Físico Materno	Dieta Obesogênica Prole
1) Controle	Não	Não
2) Exercício materno	Sim	Não
3) Dieta obesogênica	Não	Sim
4) Exercício materno + dieta obesogênica	Sim	Sim

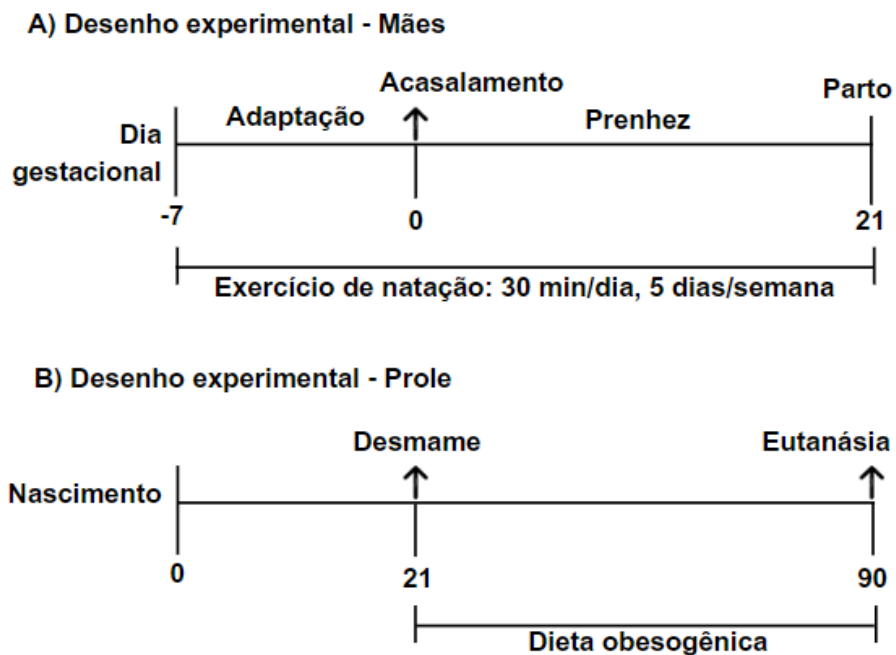


Figura 1: Desenho experimental

5.6 REAGENTES

Os reagentes utilizados para as técnicas descritas a seguir foram adquiridos de empresas especializadas, tais como a Thermo Fischer Scientific® (Waltham,

Massachusetts, USA), Promega® (Madison, Wisconsin, USA) e Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Alemanha).

5.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

5.7.1 RT-qPCR

O RNA tecidual foi isolado utilizando o reagente Trizol (Thermo Fischer Scientific®), de acordo com as instruções do fabricante e a pureza e quantificação dos RNAs extraídos foram determinadas por espectrofotometria. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega®) a partir de 2 µg de RNA, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído 200x e 4 µL utilizado nas reações de q-PCR.

As reações de q-PCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems) utilizando o kit GoTaq® qPCR (Promega). O volume total de cada reação foi de 20 µL contendo 1X GoTaq® qPCR Master Mix com BRYT Green® Dye, 300 nM de CXR Reference Dye, 200 nM de cada primer (senso e antisenso) e 4 µL de cDNA diluído 200X. As reações ocorreram por 2 min a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. As curvas de dissociação foram registradas após os 40 ciclos para avaliação da especificidade dos primers. Todas as reações foram realizadas em triplicata técnica.

Foi avaliada a expressão dos genes PGC1α, TFAM, MFN1, TUBA1B e GAPDH, sendo os dois últimos selecionados como genes normalizadores. A sequência dos primers utilizados para amplificação dos genes selecionados estão listados na tabela 2. Para determinação dos genes de referência foi utilizado o software RefFinder, que tem a implementação dos quatro principais métodos atualmente utilizados para seleção de genes normalizadores: geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2: Sequência de primers para amplificação dos genes

Genes	Sequência de primers (5'- 3')
1) PGC1α (forward)	GTGCAGCCAAGACTCTGTATGG
2) PGC1α (reverse)	GTCCAGGTCATTACATCAAGTTC
3) TFAM (forward)	GCCTGTCAGCCTTATCTGTATT
4) TFAM (reverse)	TGCATCTGGGTGTTTAGCTTTA
5) MFN1 (forward)	GGAGGGAAGACTGATGGAGATAAAG

6) MFN1 (reverse)	TGTACCTGGGCTGTCTACTAA
7) TUBA1B (forward)	GACCTGGAACCCACAGTTATT
8) TUBA1B (reverse)	CTCCTTGCCAATGGTGTAGT
9) GAPDH (forward)	CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA
10) GAPDH (reverse)	GGCATGGACTGTGGTCATGA

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados relacionados aos parâmetros morfométricos foram analisados pelo teste t-Student e ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados relacionados ao RT-qPCR foram analisados pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni. Os dados foram avaliados pelo programa GraphPad Prism 9.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. REFERÊNCIAS

- ACOG. Committee Opinion No. 804: Physical Activity and Exercise during Pregnancy and the Postpartum Period. **Obstetrics and Gynecology**, v. 135, n. 4, p. E178–E188, 2020.
- AKHAVAN, M. M. et al. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 1173–1183, 2008.
- ARDID-RUIZ, A. et al. **Potential Involvement of Peripheral Leptin/STAT3 Signaling in the Effects of Resveratrol and Its Metabolites on Reducing Body Fat Accumulation. Nutrients**, 2018.
- ARTAL, R. Exercise in Pregnancy: Guidelines. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 3, 2016.
- BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 332–344, 2015.
- BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. Sex as a Biological Variable: Who, What, When, Why, and How. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 386–396, 2017.
- BARKER, D. J. P. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, 9 set. 1989.

CARDANHO-RAMOS, C.; MORAIS, V. A. Mitochondrial biogenesis in neurons: How and where. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 1–11, 2021.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease. **Journal of clinical nursing**, v. 24, n. 23–24, p. 3716–3729, 2015.

CARTER, L. G. et al. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 5, p. 832–840, 2013.

CHAKRABARTY, R. P.; CHANDEL, N. S. Beyond ATP, new roles of mitochondria. **The Biochemist**, v. 44, n. 4, p. 2–8, 30 ago. 2022.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, 2016.

CLANCY, B. et al. Extrapolating Brain Development From. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 5, p. 931–937, 2007.

COLLIER, J. J. et al. Mitochondrial signalling and homeostasis: from cell biology to neurological disease. **Trends in Neurosciences**, p. 1–16, 2023.

DE LORENZO, A. et al. Why primary obesity is a disease? **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2019.

ESTERAS, N.; ABRAMOV, A. Y. Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: Energy metabolism and beyond. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 189, n. June, p. 136–153, 2022.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 449–456, 2013.

GIACOMELLO, M. et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 2020.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; LOW, F. M. The role of developmental plasticity

and epigenetics in human health. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 12–18, 2011.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595–601, 1992.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–299, 2010.

HARRIS, J.; BAER, L.; STANFORD, K. Maternal Exercise Improves the Metabolic Health of Adult Offspring. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

HE, F. et al. Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

HSU, C. N.; TAIN, Y. L. Animal models for DOHaD research: Focus on hypertension of developmental origins. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 1–21, 2021.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019: Atenção Primária à Saúde e Informações Antropométricas**. , 2020. Disponível em: <<https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2021/07/Pesquisa-Nacional-de-Saude-2019.pdf>>

KHACHO, M.; HARRIS, R.; SLACK, R. S. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 34–48, 2019.

KIM, H. et al. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 243–249, 1 jun. 2007.

KLEIN, C. P. et al. Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid- β in Adult Offspring Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 2022–2038, 2018.

KUSUYAMA, J. et al. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 858–872, 2020.

LEE, H.-H. et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain and Development**, v. 28, n. 3, p. 147–154, 1 abr. 2006.

LINNÉR, A.; ALMGREN, M. Epigenetic programming—The important first 1000 days. **Acta Paediatrica**, v. 109, n. 3, p. 443–452, 1 mar. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARCELINO, T. B. et al. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. **Neuroscience**, v. 246, p. 28–39, 2013.

MARCELINO, T. B. et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 30–38, 2016.

MARTINS, A. P. B. Obesity must be treated as a public health issue. **RAE**, v. 58, n. 3, p. 337–341, 2018.

MCMULLEN, S.; MOSTYN, A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 3, p. 306–320, 2009.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

PENKLER, M. et al. DOHaD in science and society: emergent opportunities and novel responsibilities. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 3, p. 268–273, 2019.

RADAK, Z. et al. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 942–946, 11 set. 2007.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. **Biogerontology**, v. 6, n. 1, p. 71–75, 2005.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 2, p. 153–159, 2008.

RAJAMOORTHY, A.; LEDUC, C. A.; THAKER, V. V. The metabolic conditioning of obesity: A review of the pathogenesis of obesity and the epigenetic pathways that “program” obesity from conception. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1–23, 2022.

RIGOULET, M. et al. Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, n. 1, p. 280–285, 1996.

ROBINSON, A. M.; BUCCI, D. J. Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring. **Neuroscience**, v. 256, p. 53–60, 2014.

SCARPULLA, R. C.; VEGA, R. B.; KELLY, D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 459–466, 2012.

SCHMITT, L. O.; GASPAR, J. M. Obesity-Induced Brain Neuroinflammatory and Mitochondrial Changes. **Metabolites**, v. 13, n. 1, p. 86, 2023.

SILVEIRA, P. P. et al. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494–504, 2007.

SOLTANI, N. et al. The exercise training modulatory effects on the obesity-induced immunometabolic dysfunctions. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 785–810, 2020.

STANFORD, K. I. et al. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 427–433, 2015.

STANFORD, K. I. et al. Maternal exercise improves glucose tolerance in female offspring. **Diabetes**, v. 66, n. 8, p. 2124–2136, 2017.

STEFANI, L.; GALANTI, G. Physical Exercise Prescription in Metabolic Chronic Disease BT - Translational Informatics in Smart Healthcare. In: SHEN, B. (Ed.). Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 123–141.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 266–269, 2017.

VENÂNCIO, C. et al. Acute ketamine impairs mitochondrial function and promotes

superoxide dismutase activity in the rat brain. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, n. 2, p. 320–328, 2015.

WASINSKI, F. et al. **Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. Nutr Metab**, 2015.

WESTBURY, S. et al. Obesity Stigma: Causes, Consequences, and Potential Solutions. **Current Obesity Reports**, p. 10–23, 2023.

WHO. Draft recommendations for the prevention and management of obesity over the life course, including potential targets. **WHO Discussion Paper**, p. 1–12, 2021.

WRANN, C. D. FNDC5/Irisin – Their Role in the Nervous System and as a Mediator for Beneficial Effects of Exercise on the Brain. **Brain Plasticity**, v. 1, n. 1, p. 55–61, 2015.

7. ANEXOS

ANEXO I – Carta de aprovação do projeto pela CEUA



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 39441

Título: Avaliação do efeito protetor do exercício físico materno sobre um modelo de obesidade pós-natal

Vigência: 17/06/2020 à 28/02/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 17/06/2020

Ismael Mesquita - desde 17/06/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 31/08/2020 - Reunião via webconferência - Sistema UFRGS - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de ratos Wistar neonatos (128 fêmeas e 128 machos) provindos do acasalamento de 64 fêmeas com 32 ratos machos, Wistar, com idade de 120 dias, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 14 de Setembro de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA

Coordenador da comissão de ética