

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Bárbara Mariño Dal Magro

**ESTADO REDOX OVARIANO: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO COM
SOBRECARGA ASSOCIADO A UM MODELO DE DIETA COM ALTO CONTEÚDO
DE GORDURA E AÇÚCAR NA PROLE ADULTA**

Porto Alegre
2021

Bárbara Mariño Dal Magro

ESTADO REDOX OVARIANO: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO COM SOBRECARGA ASSOCIADO A UM MODELO DE DIETA COM ALTO CONTEÚDO DE GORDURA E AÇÚCAR NA PROLE ADULTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Matté

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Mariño Dal Magro, Bárbara
ESTADO REDÓX OVARIANO: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO COM SOBRECARGA ASSOCIADO A UM MODELO DE DIETA
COM ALTO CONTEÚDO DE GORDURA E AÇÚCAR NA PROLE ADULTA
/ Bárbara Mariño Dal Magro. -- 2021.
112 f.
Orientadora: Cristiane Matté.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Exercício físico gestacional. 2. Dieta com alto
conteúdo de gordura e açúcar. 3. Estado redox
ovariano. 4. Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da
Doença. I. Matté, Cristiane, orient. II. Título.

Bárbara Mariño Dal Magro

ESTADO REDOX OVARIANO: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO COM SOBRECARGA ASSOCIADO A UM MODELO DE DIETA COM ALTO CONTEÚDO DE GORDURA E AÇÚCAR NA PROLE ADULTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Matté

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof. – Instituição

Prof. – Instituição

Prof. – Instituição

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não é só minha: é fruto da dedicação, colaboração e empenho de todos com quem tive o prazer de conviver nos últimos dois anos e meio, dentro e fora do PPG. A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu me tornasse a pessoa e profissional que sou hoje, meu muito obrigada. Este trabalho não seria possível não fossem as palavras de apoio e incentivo.

À minha família: Mônica e Victória – vocês são a força e o orgulho da minha vida. Minha faculdade, pós-graduação e vida profissional não seriam nada se eu não tivesse vocês duas me dando apoio, carinho e compreensão em todos os momentos. Sou eternamente grata pelo exemplo dessas duas mulheres fortes e incríveis, das quais eu morro de saudade todos os dias desde que a vida nos colocou alguns milhares quilômetros de distância. Amo vocês mais do que sou capaz de expressar em palavras. Obrigada pela paciência, pela ajuda e por sempre estarem presentes.

À minha orientadora, Profa. Cristiane Matté: obrigada pela paciência e compreensão nos momentos de dúvida, incertezas e comemorações. Obrigada por ter apostado em mim e neste trabalho.

Aos colegas que passaram pelo laboratório 23 do departamento de Bioquímica, especialmente Caroline, Juliana, Karoline, Régis, André, Vinícius, Mariana, Rafael e Felippo. Obrigada pelos momentos maravilhosos proporcionados nos últimos cinco anos nos quais fiz parte do nosso lab.

Em especial, gostaria de agradecer ao Bernardo e à Pauline, queridos colegas de lab que tornaram esse mestrado possível. Obrigada, Ber, por ser meu parceiro de laboratório neste ano de pandemia, pelo apoio, carinho, força, por me ouvir nos momentos bons e aguentar as reclamações nos maus momentos. À Pauline por ter disposto tempo, paciência e carinho para ensinar uma mestranda cheia de dúvidas. Amo vocês dois demais.

Aos colegas de trabalho com quem eu pude partilhar os anos de mestrado: Norma, Luiza Donatti, Marília, Caroline, Gerta, Iuri, Nina e Luiza Pretto. Obrigada pelo carinho, pelo apoio e pelo incentivo sempre.

Ao Gabriel e Rafael: obrigada por serem amigos maravilhosos. Por ouvirem minhas reclamações e por comemorarem os momentos bons.

A todos os funcionários e servidores do PPG e do Departamento de Bioquímica, em especial Silvana, Cleia e Giordano: obrigada pela paciência e compreensão em todos os momentos.

Agradeço, em especial, a todos os ratinhos.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq por proporcionarem as bolsas e verbas de pesquisa para a realização deste e outros trabalhos.

RESUMO

De acordo com a hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD, do inglês Developmental Origins of Health and Disease), intervenções no início da vida podem ter papéis duradouros sobre a saúde da prole. O conceito de DOHaD estabelece que o período periconcepcional é considerado como uma janela útil de programação do indivíduo, com diversos pesquisadores demonstrando que a prática de exercícios físicos e o consumo de dietas balanceadas podem exercer efeitos positivos sobre a saúde global da prole. Pesquisas demonstram a influência que intervenções intrauterinas possuem sobre a prole, nomeadamente como a intervenção durante o período de desenvolvimento intrauterino pode levar à alteração das células germinativas da prole e, subsequentemente, afetar a saúde da prole seguinte. Considerando efeitos na saúde reprodutiva, o presente estudo avaliou os efeitos do exercício de natação, com sobrecarga de 2% do peso corporal, aplicado antes e durante a gestação de ratas Wistar, seguido pela administração pós-natal de uma dieta contendo altos conteúdos de gordura e açúcar para a prole dos animais adultos durante 10 semanas a partir do desmame. Foi avaliado o peso corporal dos filhotes durante o protocolo de dieta, marcadores histopatológicos ovarianos, homeostasia redox ovariana e parâmetros de oxidação proteica ovarianos, além de vias de sinalização moleculares relacionadas, como imunoconteúdo de mitofusina-1 (Mfn-1), e formas total e fosforiladas de forkhead box O3 (FOXO3a) e proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK). Nossos dados demonstram que a prole nascida de mães exercitadas tem um atraso de duas semanas no ganho de peso quando consumindo dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar, demonstrando um caráter protetivo da intervenção pré-natal sobre esse parâmetro. Animais de todos os grupos demonstraram alterações morfológicas como vacuolização e infiltrado de hemácias no córtex ovariano. A intervenção de natação gestacional com sobrecarga foi capaz de reduzir a atividade enzimática da superóxido-dismutase (SOD) e a razão antioxidante relacionada à percepção do status redox celular nos ovários das filhotes submetidas à natação com sobrecarga durante a gestação seguida de consumo de dieta com alto conteúdo de açúcar e gordura no período pós-natal. Além de diminuir a atividade enzimática da SOD, a administração de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar levou à diminuição também da atividade da glutationala-peroxidase (GPx), bem como aumentou a razão pFOXO3a/FOXO3a nos ovários da prole

submetida às intervenções de exercício físico gestacional e dieta de alto conteúdo de gordura e açúcar. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a homeostase redox e vias relacionadas à sinalização molecular em ovários da prole submetida à natação gestacional com 2% de sobrecarga seguida de administração pós-natal de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar, sugerindo que a combinação das intervenções causa leves efeitos prejudiciais, principalmente à homeostasia redox ovariana.

ABSTRACT

According to the developmental origins of health and disease (DOHaD) hypothesis, early life interventions can play a life-long role in the offspring's health. Since the DOHaD concept establishes the pregnancy and surrounding periods as critical programming windows, research indicates that the practice of physical exercise and consumption of balanced diets can have positive effects on the offspring's overall health. Concerning transgenerational effects, research has demonstrated the influence of intrauterine interventions on offspring reproductive health. This study assessed the effects of maternal swimming (2% overload) one week prior and during all pregnancy followed by a postnatal high-fat, high-sugar diet consumption for 10 weeks on the ovaries of female adult Wistar rats. We evaluated offspring's bodyweight, histomorphological ovarian markers, antioxidant network, protein oxidation status, and related molecular pathways, such as of mitofusin-1, *forkhead box O3* (FOXO3a), and AMPK-activated protein kinase (AMPK) immunoccontents. Our study demonstrated that the offspring born to exercised dams show a 2-week delay in weight gain when compared to sedentary-born animals, demonstrating a positive protective effect of swimming during pregnancy, at least in this parameter. Animals from all groups displayed normal morphological characteristics of all follicle types and mild morphological alterations, such as vacuolization and blood infiltrates in ovarian cortex. Concerning the combination of pre and postnatal protocols, there was mild statistical interaction on the parameters evaluated. In relation to each intervention alone, the maternal exercise protocol (with overload) led to a reduction of both, superoxide dismutase (SOD) activity and a known index of cellular oxidative stress, also reducing mitofusin-1 immunoccontent. On the other hand, the postnatal high-fat, high-sugar diet alone led to diminished SOD and glutathione peroxidase (GPx) activities, and increased the pFOXO3a/FOXO3a ratio in offspring ovaries. This study is the first to assess redox network and molecular pathways in offspring ovaries subjected to both pre and postnatal interventions, suggesting that maternal swimming with 2% bodyweight overload combined with HFHS diet during postnatal life leads to harmful effects on the ovarian redox network of offspring.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOHaD	Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
E2	Estradiol
FOXO3a	<i>Forkhead box O3</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GLO I	Glioxalase 1
GLO II	Glioxalase 2
GPx	Glutaciona-peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HFHS	Dieta com alto conteúdo de alta gordura e açúcar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
P4	Progesterona
pAMPK	Forma fosforilada de proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
pFOXO3a	Forma fosforilada de <i>Forkhead box O3</i>
SOD	Superóxido-dismutase
SOP	Síndrome dos ovários policísticos

SUMÁRIO

PARTE I	11
1 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD) ..	12
1.1 Conceito	12
1.2 DOHAD, parâmetros reprodutivos e nutrição	13
2 ESTRESSE OXIDATIVO	16
3 EXERCÍCIO FÍSICO	19
3.1 Exercício físico e fertilidade	20
3.2 Exercício físico gestacional	22
4 INTERVENÇÕES NUTRICIONAIS	24
4.1 Dieta e mundo ocidental	24
4.2 Obesidade	24
4.3 Estresse oxidativo e dieta	26
4.4 Ovário, dieta e estresse oxidativo	27
5 OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo geral	29
5.2 Objetivos Específicos	29
PARTE II – DADOS EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO	30
PARTE III	62
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A – Carta de aprovação do projeto na CEUA/UFRGS	101
ANEXO B – Regras de Publicação – “Journal of Ovarian Research”	102
APÊNDICE A – Material Suplementar do artigo científico	110

PARTE I

1 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD)

1.1 Conceito

O estudo sobre os efeitos dos eventos durante o período intrauterino tornou-se mais visível em 1986, quando David Barker descreveu a associação entre desnutrição após o nascimento e morte coronária precoce, hipotetizando que a má nutrição no início de vida resultaria em uma maior suscetibilidade à mortalidade por doenças cardíacas na vida adulta (BARKER, 1986a; SUZUKI, 2018). Nos anos seguintes, Barker *et al.* (1989) continuaram a publicar dados sobre os efeitos da má nutrição pré-natal e o efeito resultante em diversas doenças não comunicáveis no período de vida adulta (BARKER; OSMOND, 1986a; BARKER, 2007; BARKER *et al.*, 1989; OSMOND *et al.*, 1993).

O que inicialmente foi descrito como a “Hipótese de Barker”, atualmente é definido como as Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHAD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*), englobando diversas intervenções durante o período de desenvolvimento e seu impacto na vida adulta da prole (SUZUKI, 2018). Recentemente, já é sabido que o status de saúde do indivíduo pode influenciar o desenvolvimento dos gametas de sua prole e, por consequência, o desenvolvimento de seus netos (REIK, 2001; SUZUKI, 2018). Em relação a estratégias envolvendo DOHAD e a saúde da prole, muitos são os estudos em modelos animais sobre o tema. O nosso grupo de pesquisa já demonstrou, por exemplo, que a natação antes e durante a gestação não altera características físicas e de desenvolvimento da prole nos primeiros dias de vida (STONE *et al.*, 2015), mas promove uma melhora em parâmetros bioquímicos encefálicos das ratas mães (MARCELINO *et al.*, 2013) e sua prole (MARCELINO *et al.*, 2013, 2016; STONE *et al.*, 2015). Em relação a doenças não comunicáveis, Klein *et al.* (2018) já demonstraram que a natação como exercício físico gestacional é capaz de prevenir os efeitos neurotóxicos do peptídeo beta amiloide em regiões encefálicas da prole masculina. De forma semelhante, outros estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a prática de exercício físico como forma de intervenção durante o período gestacional pode causar alteração do fenótipo da prole (HERRING *et al.*, 2012; KLEIN *et al.*, 2019; WASINSKI *et al.*, 2015).

Os resultados provenientes dos estudos de DOHaD já podem ser vistos com uma abordagem prática na clínica, como é o caso da campanha “Primeiros Mil Dias”, que busca disseminar a importância do status nutricional durante a gestação até os dois primeiros anos de vida, incluindo a essencialidade do aleitamento materno (HANSON; POSTON; GLUCKMAN, 2019). Além disso, outros grupos mundiais buscam inserir o conceito de DOHaD em suas iniciativas, permitindo disseminar o conceito e a importância do período de desenvolvimento. A Federação Internacional de Ginecologistas e Obstetras possui um grupo de trabalho que estuda a nutrição durante a adolescência, concepção e maternidade, com recomendações baseadas no conceito de DOHaD (HANSON *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulga recomendações relacionadas a DOHaD desde 2006, com reportes sobre a otimização de desfechos gestacionais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Ainda relacionado a isso, a OMS estabeleceu a “*Commission on Ending Childhood Obesity*” desde 2017, com a premissa de que os efeitos da vida inicial podem influenciar a vida tardia dos indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Infelizmente, por mais benéficas que tenham sido as recomendações da OMS sobre o tema, ainda são poucos os países que sinalizam alimentos considerados não saudáveis durante a infância (HANSON; POSTON; GLUCKMAN, 2019).

Considerando estratégias nutricionais, nosso grupo de pesquisa já demonstrou os efeitos prejudiciais de uma restrição alimentar severa sobre as ratas-mães e sua prole (DAL MAGRO *et al.*, 2020; STONE *et al.*, 2016); porém, estudos com restrição calórica leve, de 20%, suplementada com micronutrientes, demonstraram benefícios em parâmetros de defesas antioxidantes e mitocondriais sobre o encéfalo da prole durante o desenvolvimento (STONE *et al.*, 2019b, 2019a), além de não alterar o comportamento dos filhotes e promover comportamento nutricional benéfico (STONE *et al.*, 2019c).

1.2 DOHaD, parâmetros reprodutivos e nutrição

Em relação a órgãos reprodutivos, nosso grupo de pesquisa já observou o efeito sobre testículos e ovários da prole adulta submetida à restrição calórica de 20%, suplementada com micronutrientes, durante o desenvolvimento intrauterino, demonstrando haver alteração em parâmetros antioxidantes, de peroxidação lipídica e em vias de sinalização associadas à intervenção alimentar (DAL MAGRO *et al.*,

2020). Neste estudo, houve administração de uma restrição calórica de 20% em relação à quantidade consumida pelo grupo controle durante os 21 dias de gestação de ratas Wistar (DAL MAGRO *et al.*, 2020). Após o nascimento, os animais foram mantidos sob dieta controle após o desmame até o dia pós-natal 60, quando tiveram seus órgãos coletados para análises bioquímicas. O artigo publicado relatou aumento da atividade enzimática de SOD e diminuição da atividade de glioxalase 1 (GLO I) nos ovários dos animais, além de aumento de peroxidação lipídica e no conteúdo de oxidantes, como superóxido mitocondrial (DAL MAGRO *et al.*, 2020). A restrição calórica moderada também foi capaz de elevar o imunocônteuído de sirtuína 3, uma deacetilase mitocondrial capaz de perceber o estado redox celular e, de forma subsequente, ativar a expressão de genes relacionados à bioenergética celular (HOUTKOOOPER *et al.*, 2010).

Outros grupos já demonstraram que, em relação à obesidade, é possível observar alteração hormonal e em comportamento sexual de animais cujas mães consumiram dieta considerada hipercalórica (JACOBS *et al.*, 2014). Além disso, os machos submetidos a intervenções similares demonstram deficiência de testosterona acompanhada por redução na contagem espermática e de células da gametogênese (NAVYA; YAJURVEDI, 2017). Relativo a estudos com humanos, filhos de mães obesas tendem a começar a puberdade precocemente quando comparados a filhos de mães com peso dentro da normalidade (HOUNSGAARD *et al.*, 2014; JAZWIEC; SLOBODA, 2019).

Considerando parâmetros reprodutivos femininos, utilizando modelos gestacionais de obesidade induzida por dieta, foi possível observar desenvolvimento precoce de puberdade feminina (JACOBS *et al.*, 2014), além de risco aumentado para o desenvolvimento de câncer mamário (HILAKIVI-CLARKE; CLARKE; LIPPMAN, 1999). Estudos mais recentes já demonstraram que dietas com alto conteúdo de gordura reduzem consideravelmente o número de oócitos, o que é significativamente correlacionado à adiposidade materna (TSOULIS *et al.*, 2016). Em camundongos, já foi observado que a perda de peso não reverte os efeitos metabólicos da obesidade, ainda havendo acúmulo lipídico em oócitos, alteração em metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e alteração do potencial de membrana mitocondrial (REYNOLDS *et al.*, 2015). Em relação à mitocôndria, estudos já demonstraram função prejudicada em embriões provenientes de gestações complicadas pela diabetes (WANG *et al.*, 2009); entretanto, um estudo reportou desenvolvimento embrionário inicial normal em

fêmeas obesas e férteis (BERMEJO-ALVAREZ; ROSENFELD; ROBERTS, 2012; GRINDLER; MOLEY, 2013). Em humanos, já foi possível observar prejuízos oocitários, como disfunção mitocondrial (GRINDLER; MOLEY, 2013), lipotoxicidade (JUNGHEIM *et al.*, 2011) e aumento de oxidantes em mulheres obesas (AGARWAL *et al.*, 2012).

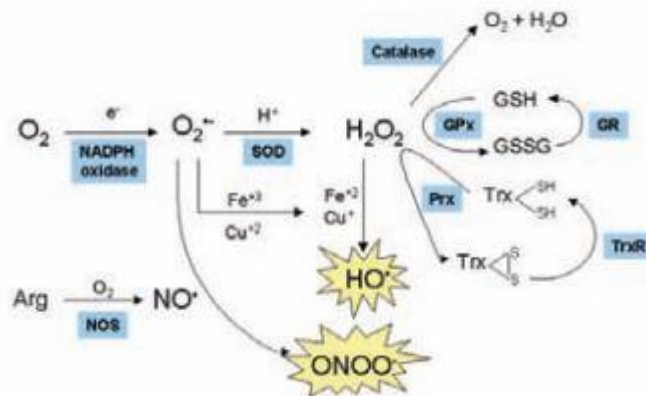
2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo surge em um contexto de desequilíbrio entre produção de oxidantes e a proteção pelo sistema de defesa antioxidante (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). A definição de estresse oxidativo foi primariamente cunhada por Sies (1991). Tal definição menciona que “[...] um distúrbio do pró-oxidante para o antioxidante em favor das espécies oxidantes leva a dano potencial” (SIES, 1991). Corroborando, Jones (2006) defendeu a hipótese de que o aumento do estresse oxidativo seria devido ao desequilíbrio na relação glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG) no organismo. Posteriormente, Sies (2018) redefiniu o termo estresse oxidativo como “[...] um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando à perturbação da sinalização redox e controle e/ou dano molecular”. Os oxidantes incluem espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o oxigênio *singlet* (1O_2), além de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como óxido nítrico (NO^{\cdot}) e espécies reativas de ferro, cobre e enxofre (HALLIWELL, 1995, 1992). Essas moléculas podem ser globalmente denominadas de oxidantes e são produzidas de forma endógena e fisiológica majoritariamente pela mitocôndria (JONES, 2006; MAILLOUX, 2015), podendo também ser advindas de outras reações, como complexo enzimático citocromo P450, beta-oxidação de ácidos graxos no peroxissomo e ativação de células fagocitárias (GILCA *et al.*, 2007; HALLIWELL, 1993; POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013).

Ainda que existam antioxidantes exógenos, provenientes da dieta, o organismo sintetiza defesas endógenas (Figura 1). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Recentemente, Halliwell e Gutteridge (2015) definiram o termo antioxidante como “[...] qualquer substância capaz de atrasar, impedir ou remover dano oxidativo a moléculas alvo”. Em humanos, a maior parte da capacidade total antioxidante é proveniente da glutatona reduzida (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, considerada o principal tampão redox da célula (AOYAMA; NAKAKI, 2013, 2015) devido à sua utilização por enzimas e reação direta com diferentes tipos de oxidantes (HALLIWELL, 2006). A GSH é sintetizada no citoplasma de todos os tipos celulares, onde ocorre captura pela mitocôndria, resultando na organela possuir de 10 a 20% da concentração celular total de GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Conveniente a antioxidantes endógenos, a

enzima SOD (EC 1.15.1.1), em suas três isoformas celulares, desempenha a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, formando O_2 e H_2O_2 (HALLIWELL, 2006; MCCORD; FRIDOVICH, 1969), com maior poder redutor que antioxidante. A descoberta da SOD foi a base do conhecimento para o estudo e entendimento das defesas antioxidantes. Entretanto, mesmo as isoformas da SOD sendo altamente eficientes na remoção de $O_2^{\cdot-}$, podem promover outras reações, como a nitração de resíduos de tirosina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A partir da destoxificação de $O_2^{\cdot-}$ pela SOD, o H_2O_2 resultante pode atravessar membranas, e, mesmo que pouco danoso, pode levar à formação do radical hidroxil (OH^{\cdot}) (BRINKMANN; BRIXIUS, 2017; HALLIWELL, 2006). A principal enzima responsável pela destoxificação desse oxidante dentro do peroxissomo é a catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), que dismuta o H_2O_2 , utilizando-o como substrato, liberando água e oxigênio (HALLIWELL, 2006; SIES, 2014). A CAT tem localização dentro de peroxissomos, estruturas-chave na degradação de ácidos graxos de cadeia longa, onde existem altas taxas de produção de H_2O_2 endógeno durante a oxidação de ácidos graxos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Além da CAT, a enzima glutationa-peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) também realiza a eliminação de H_2O_2 (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; HALLIWELL, 2006), tornando-se o principal mecanismo de remoção de H_2O_2 citosólico e mitocondrial, por meio da utilização de GSH para sua reação de catálise. Diferentemente da CAT, a GPx remove o H_2O_2 utilizando-o para oxidar outro substrato, a GSH. Além disso, a GPx é capaz de promover, pela catálise dependente de GSH, a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos, além de outros hidroperóxidos sintéticos. A enzima glioxalase 1 destoxifica subprodutos relacionados ao metilglioxal até a liberação em forma de ácido láctico (ALLAMAN; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2015). O metilglioxal é proveniente de reações não-enzimáticas a partir de intermediários da glicólise e durante peroxidação lipídica. A reação entre o metilglioxal e a GSH gera um complexo oxidado pela GLO I em S-d-lactoilglutaciona que é hidrolisado pela isoforma 2 da glioxalase (GLO II), ocorrendo liberação de D-ácido láctico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 1. Esquema das reações e respectivas enzimas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio



Nota: Arg: arginina; Cu^{+2} : cobre; e^- : elétron; Fe^{+3} : ferro; GPx: glutaciona-peroxidase; GR: glutaciona-redutase; Grx: glutarredoxina; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada; H^+ : próton; HO^{\cdot} : radical hidroxil; NOS: óxido-nítrico-sintase; ONOO $^{\cdot}$: peroxinitrito; Prx: peroxirredoxinas; SOD: superóxido-dismutase; Trx: tioredoxina. Fonte: Adaptado de Barbosa, Medeiros e Augusto (2006).

3 EXERCÍCIO FÍSICO

A atividade física é definida como “[...] qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos requerendo gasto energético” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, p. 53, tradução nossa), ou seja, quaisquer comportamentos motores, incluindo atividades diárias e de lazer, determinantes para a saúde geral do indivíduo (BURKHALTER; HILLMAN, 2011). Comumente confundindo com a prática de atividade física (MANDOLESI *et al.*, 2018), o exercício físico é definido como “[...] uma subclassificação da atividade física que seja planejada, estruturada, repetitiva, cujo objetivo final ou intermediário seja a melhora ou a manutenção de um ou mais componentes da aptidão física” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, p. 52, tradução nossa).

Estudos já demonstraram que exercício físico regular é essencial para determinar a saúde do indivíduo, diminuir o estresse oxidativo e prevenir doenças crônicas (RADAK *et al.*, 2013). A correlação entre a intensidade do exercício físico e o estresse oxidativo em adultos demonstra que os extremos, sedentarismo e exercício de exaustão, estão relacionados ao aumento dos níveis de estresse oxidativo, enquanto exercícios físicos moderados tendem a diminuir esses níveis (BOUZID *et al.*, 2015).

O exercício físico é associado a numerosos benefícios para a saúde, promovendo adaptações metabólicas em diversos tecidos do organismo, com potencial preventivo e terapêutico contra diversas doenças (BIANCHI *et al.*, 2017; GUERRIERI; MOON; PRAAG, 2017). Estudos de diversos grupos já demonstraram melhora de desenvolvimento acadêmico em crianças, prevenção de declínio cognitivo e redução do risco de demência em populações idosas associados à prática de exercício físico (MANDOLESI *et al.*, 2018). O exercício físico é capaz de modular efeitos prejudiciais do envelhecimento, como prover proteção a condições associadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, diabetes (DE SOUTO BARRETO *et al.*, 2017) e câncer (CELIS-MORALES *et al.*, 2017). Além disso, já foi demonstrado que a prática de apenas uma sessão de exercício físico aeróbico é capaz de promover aumento de marcadores relacionados ao desenvolvimento e diferenciação neuronal (SZUHANY; BUGATTI; OTTO, 2015). Relacionado a benefícios duradouros, estudos recentes já demonstraram que o exercício físico

promove melhora da qualidade óssea feminina, sendo indicado o início da prática durante a adolescência (TROY *et al.*, 2018).

O exercício modula processos mitocondriais, tais como fusão, fissão e biogênese mitocondrial, descritos como adaptações metabólicas favoráveis ao aumento da capacidade oxidativa celular (FEALY *et al.*, 2014; VIÑA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012). Além disso, o exercício físico aumenta a expressão de mitofusinas (Mfn) (FEALY *et al.*, 2014) e reduz a expressão da proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1), influenciando a dinâmica mitocondrial (FEALY *et al.*, 2014). A atividade física exige do organismo uma maior produção de ATP, consequentemente resultando no aumento da produção de espécies reativas (GUERRIERI; MOON; PRAAG, 2017). Esse aumento da demanda energética promove a ativação das proteínas desacetilases dependentes de NAD⁺, como as sirtuínas (VARGAS-ORTIZ; PÉREZ-VÁZQUEZ; MACÍAS-CERVANTES, 2019), e da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), esta podendo ser ativada diretamente pelas espécies reativas (MUNGAI *et al.*, 2011), ambas regulando a atividade de fatores transcricionais relacionados ao metabolismo energético (LI; KAZGAN, 2011; RICHTER; RUDERMAN, 2009).

3.1 Exercício físico e fertilidade

Atualmente, sabe-se que a infertilidade e problemas reprodutivos podem ser associados ao estilo de vida, extremos do índice de massa corporal e idade (JURKOWSKI *et al.*, 1978). Em relação ao estilo de vida, muito se discute sobre o impacto do exercício físico sobre a infertilidade.

Em relação ao sistema reprodutor feminino, o efeito do exercício físico sobre hormônios ovarianos é estudado desde 1978, quando Jurkowksi *et al.* avaliaram a relação entre esses fatores em mulheres jovens com ciclos menstruais regulares (JURKOWSKI *et al.*, 1978). Estudos demonstram que o exercício físico pode ser benéfico à fertilidade de mulheres com sobrepeso ou obesidade, uma vez que há melhora quando a atividade física é aliada à perda de peso (RICH-EDWARDS *et al.*, 2002; SILVESTRIS *et al.*, 2018). Entretanto, os dados são controversos; indivíduos que exercem atividade física de alto impacto tem risco aumentado de anovulação, amenorreia e possível falha de implantação embrionária (GIVIZIEZ *et al.*, 2016; RICH-EDWARDS *et al.*, 2002). Há significativa associação entre exercício de alto impacto e

infertilidade ovulatória entre mulheres com infertilidade primária (nuligestas, sem estabelecimento de gestação em 12 meses de tentativas) (GREEN *et al.*, 1986). Em estudo conduzido por Foucaut *et al.* (2019), não houve correlação significativa em relação à prática de atividade física e infertilidade. Em relação ao comportamento sedentário, este já foi associado positivamente com secreção de leptina (BRANNIAN *et al.*, 2001), hormônio que pode alterar a fertilidade e taxas de gravidez pela regulação do eixo hormonal hipotálamo-pituitária/ovário (JUNGHEIM; MOLEY, 2010). Os estudos também são controversos em pacientes inférteis que fazem tratamento via fertilização *in vitro*; Morris *et al.* (2006) demonstraram que mulheres cuja prática de exercício físico excedia 4 horas por dia nos anos anteriores ao tratamento tinham maior probabilidade de falha de implantação do embrião ou perda gestacional. Já Ricci *et al.* (2020) observaram menor risco de gravidez clínica em mulheres cujo exercício físico leve excedia 5 horas/semana, mas não houve efeito significativo sobre a taxa de nascido vivo. Em estudo translacional recente, foi possível identificar que mulheres praticantes de altos índices de atividade física tinham risco reduzido de problemas de infertilidade, enquanto baixos níveis de atividade física e índice de massa corporal aumentado estavam correlacionados à maior probabilidade de infertilidade (RICH-EDWARDS *et al.*, 2002).

A literatura já demonstra que mulheres praticantes de natação são predispostas a desordens menstruais e atraso na puberdade (CONSTANTINI; WARREN, 1995). Nadadoras pré-menarca apresentam aumento de estradiol (E2) em comparação com nadadoras pós-menarca, ainda que todos os valores estejam dentro da normalidade (CONSTANTINI; WARREN, 1995). Em estudo conduzido por Saadat *et al.* (2016), camundongos fêmeas submetidas a nado forçado leve 5 vezes na semana por 2 semanas demonstraram menor número de folículos secundários e antrais em comparação com o grupo sedentário. Além disso, também foi visualizada diminuição no número de receptores de estrogênio no ovário e útero dos animais submetidos ao protocolo de exercício físico no mesmo estudo, além de diminuição nos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e E2 séricos (SAADAT *et al.*, 2016). Tais dados são corroborados por estudos de outros grupos, que demonstraram diminuição dos níveis séricos de E2 e progesterona (P4) em ratos submetidos ao protocolo de nado forçado (QIU *et al.*, 2009). Além disso, o nado forçado leva à alteração do ciclo estral dos animais, bem como à alteração no nível sérico de corticosterona quando em comparação com animais sedentários ou passando por outros tipos de estresse

(AXELSON, 1987). Em relação a patologias ovarianas, em animais com síndrome dos ovários policísticos (SOP) induzida por medicação, o exercício de natação é capaz de diminuir os níveis de hormônios androgênicos quando comparados a animais SOP-*like* sedentários; ao mesmo tempo, não há alteração de parâmetros como E2 e P4, demonstrando o efeito positivo do exercício físico sobre parâmetros bioquímicos da síndrome (WU *et al.*, 2014).

3.2 Exercício físico gestacional

Intervenções durante o período gestacional podem causar modificações que sejam favoráveis a uma vida saudável e proteger os filhos contra o desenvolvimento de algumas doenças metabólicas (KLEIN *et al.*, 2019), exercendo diversos benefícios à saúde da mãe e melhora na saúde metabólica da prole (VEGA *et al.*, 2015).

Os benefícios à saúde da prole têm sido atribuídos ao exercício quando este é praticado antes e durante a gestação, mesmo que diferentes modalidades de exercício sejam empregadas (KLEIN *et al.*, 2018; VEGA *et al.*, 2015). Vega *et al.* (2015) estudaram o efeito de exercício físico e dieta com alto conteúdo de gordura no período pré e pós-natal sobre parâmetros maternos e da prole, demonstrando alteração de parâmetros bioquímicos de animais provenientes de dieta obesogênica gestacional, o que é prevenido quando associado à prática de exercício físico intraútero. Em relação à fertilidade, nas mães da dieta obesogênica houve uma drástica redução de fertilidade, o que foi novamente prevenido pelo exercício (VEGA *et al.*, 2015). Tal efeito é corroborado por outros grupos de pesquisa, como Carter *et al.* (2012), que observaram melhora em parâmetros glicêmicos de camundongos machos e fêmeas cujas mães fizeram exercício.

3.2.1 Exercício físico gestacional e parâmetros reprodutivos da prole

Poucos são os estudos demonstrando o efeito do exercício físico gestacional sobre parâmetros reprodutivos da prole. Até o presente momento, não há estudos na literatura que correlacionem tais fatores em humanos. Em modelos animais, os estudos são escassos. Utilizando porcos, um estudo avaliou o efeito da prática de caminhada durante parte da gestação sobre útero e ovários da prole (KAMINSKI *et al.*, 2014). Quinze horas após o nascimento, os órgãos foram coletados dos animais

mais pesados e mais leves da prole (KAMINSKI *et al.*, 2014). O grupo encontrou aumento do peso dos ovários no grupo exercício, independentemente da idade e peso dos animais. Em ovários neonatos, foi possível observar maior incidência de células proliferativas, sem relação à peso ou prática de exercício físico; entretanto, no estágio adolescente, foi possível verificar aumento do mesmo índice na prole com maior peso proveniente do grupo de exercício físico materno (KAMINSKI *et al.*, 2014).

Em relação à natação como exercício físico gestacional, não há estudos na literatura demonstrando o impacto dessa intervenção sobre os órgãos reprodutivos da prole. Em outros tecidos, já foi observado que a natação materna antes e durante a gestação não altera o desenvolvimento neuromotor e de características físicas da prole nos primeiros dias pós-natal (MARCELINO *et al.*, 2016; ROBINSON; BUCCI, 2014), além de promover melhora em defesas antioxidantes e parâmetros mitocondriais em outros órgãos de ratas-mães e sua prole (KLEIN *et al.*, 2018; MARCELINO *et al.*, 2013; STONE *et al.*, 2015). De forma semelhante, estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que intervenções maternas durante a gestação são capazes de alterar o fenótipo (LI; SLOBODA; VICKERS, 2011; ZHENG *et al.*, 2020), além de possuir a habilidade de influenciar o desenvolvimento de doenças crônicas (HARRIS; BAER; STANFORD, 2018; RODRIGUEZ-CARO; WILLIAMS, 2018).

4 INTERVENÇÕES NUTRICIONAIS

4.1 Dieta e mundo ocidental

Muito se estuda o impacto da dieta sobre doenças crônicas não transmissíveis. Desde os anos 1990, estudos e revisões evidenciam o efeito da dieta ocidental (ou *Western diet*) sobre alterações metabólicas (CORDAIN *et al.*, 2005). Comumente chamadas de doenças ocidentais devido à baixa predominância em povos orientais e do leste europeu, já foi verificado que imigrantes têm probabilidade aumentada de doenças coronárias e câncer após a imigração ao ocidente devido ao consumo de dietas ricas em calorias, gorduras, proteínas, com pouca fibra ou carboidratos complexos, em detrimento de dietas vegetarianas ou semivegetarianas do local de origem (EATON; KONNER, 1985; GARN; LEONARD, 2009).

Atualmente, estudos demonstram que as doenças mais comuns do século XX, causadas por agentes infecciosos, foram substituídas, no século XXI, por doenças sistêmicas, como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer (CORDAIN *et al.*, 2005; KOPP, 2019). A nutrição humana foi drasticamente alterada há cerca de 10 mil anos, com a revolução agrícola, mas as mudanças nutricionais provenientes de há cerca de 250 anos são as de maior impacto (KOPP, 2019). O genoma humano praticamente não foi alterado nos últimos dois séculos, seguindo adaptado ao consumo de dietas paleolíticas ou “de caça” (EATON; KONNER, 1985), constituídas de pescados, tubérculos, frutas e carboidratos com baixos efeitos glicêmicos e insulínicos, enquanto o mundo é agora governado pelas dietas ultra processadas, ricas em carboidratos, açúcares e cereais (JAMES *et al.*, 2001; KOPP, 2019).

4.2 Obesidade

A obesidade, atualmente considerada como pandemia mundial, tem crescido de forma alarmante desde os anos 1970 (BLÜHER, 2019). A doença foi primeiramente percebida nos Estados Unidos, mas já é observada em todos os países do mundo nas últimas décadas (BLÜHER, 2019). Apesar de extensas pesquisas já feitas e em andamento sobre o assunto, as causas dessa rápida disseminação da obesidade

ainda não foram completamente elucidadas (CHOQUET; MEYRE, 2011). Entretanto, já é sabido que a obesidade é proveniente de um estado crônico de excesso de energia acumulado, levando ao armazenamento de quantidades excessivas de triglicerídeos no tecido adiposo. Sabe-se também que fatores genéticos, epigenéticos e de estilo de vida contribuem para o quadro (CUTHBERTSON *et al.*, 2017). A genética pode até prever a capacidade de o indivíduo ganhar peso (CHOQUET; MEYRE, 2011), porém não parece ser a causa pela qual a obesidade tem aumentado sua prevalência mundial nas últimas décadas (KOPP, 2019). Em modelo animal, foi possível confirmar que a hipersecreção de insulina leva à alteração do metabolismo lipídico, promovendo obesidade (ERION; CORKEY, 2017; KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011). Estudos já demonstraram que a concentração plasmática de insulina pode ser correlacionada ao ganho de peso (BROWN *et al.*, 2017). Além disso, estudos da dinâmica de insulina entre crianças em idade escolar sugerem que a hipersecreção insulinêmica leva à sua resistência no organismo (PREEYASOMBAT *et al.*, 2005).

A hiperinsulinemia do indivíduo é persistente durante o dia a dia devido ao atual quadro de superalimentação, lanches frequentes e alto consumo de bebidas açucaradas (CORKEY, 2012), resultando em uma significativa parte do dia ser em estado pós-prandial (KUMAR *et al.*, 2020). Correlacionado a isso, estudos hipotetizam que uma resposta hiper secretória das células beta pancreáticas poderiam ser a causa do quadro de obesidade e resistência à insulina individualmente (KASUGA, 2006), uma vez que hiperinsulinemia já foi descrita como predecessora de ambos (KIM; REAVEN; KIM, 2017). Cabe ressaltar que as células beta pancreáticas são consideradas pouco evoluídas, do ponto de vista genético, para lidar com grandes necessidades insulinêmicas, ou seja, o consumo de dietas que necessitem desse grande aporte de insulina tende a causar hipertrofia e disfunção dessas células, levando a quadros de hiper-resposta e hipersecreção em dietas que não requerem tanto aporte (KOPP, 2019).

Estudos mais recentes demonstraram que, além de alterações sistêmicas, como evidenciado por resistência à insulina, as dietas modernas podem levar a distúrbios metabólicos por meio do aumento da produção de oxidantes e, conseqüentemente, de efeitos do estresse oxidativo (BONOMINI; RODELLA; REZZANI, 2015). Em conjunto, teoriza-se que oxidantes, estresse oxidativo, resistência à insulina, inflamação crônica e ativação anormal de sistemas metabólicos seriam os principais causadores das doenças da civilização ocidental, como diabetes

tipo 2, aterosclerose, hipertensão, câncer e outros (BONOMINI; RODELLA; REZZANI, 2015; VONA *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2017).

4.3 Estresse oxidativo e dieta

Estudos recentes demonstraram que a produção de oxidantes em excesso e o estresse oxidativo associado podem levar ao desenvolvimento de quadros de resistência à insulina e inflamação (PEÑA-OYARZUN *et al.*, 2018), além de doenças como câncer, aterosclerose, cardiomiopatia e hipertensão (CAMPS, 2014; CARRIER, 2017). O nível de estresse oxidativo já foi relacionado diretamente ao aumento de glicose e triglicerídeos circulantes após refeições (MANUEL-Y-KEENOY *et al.*, 2005), bem como situações hipercalóricas sem gasto energético podem levar à exacerbação do funcionamento mitocondrial, evidenciado pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial (BUSSEROLLES *et al.*, 2002).

Pesquisas já evidenciaram que dietas de alto índice glicêmico (ANDERSON *et al.*, 2018) e com alto conteúdo de açúcar (RUIZ-RAMÍREZ *et al.*, 2011) levam ao aumento dos níveis de oxidantes, também correlacionado com a glicose pós-prandial (O'KEEFE; GHEEWALA; O'KEEFE, 2008). De maneira contrastante, dietas paleolíticas e mediterrâneas são associadas a baixos níveis de estresse oxidativo (WHALEN *et al.*, 2016). Estudos clínicos já demonstraram alteração do estresse oxidativo dependendo da intervenção dietética (BILLINGSLEY; CARBONE, 2018). Asemi *et al.* (2014) encontraram diminuição de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo em pacientes hipertensos após 8 semanas de dieta hipocalórica, com alto consumo de frutas e vegetais ricos em antioxidantes, além de vitamina C. Pesquisadores demonstraram alteração na capacidade antioxidante total de pessoas com sobrepeso que faziam consumo de licopeno; entretanto, tal resultado não foi observado em pessoas com obesidade, hipotetizando-se que o potencial antioxidante do licopeno seja dependente da dose e do estado metabólico de cada indivíduo (GHAVIPOUR; SOTOUDEH; GHORBANI, 2015). Estudos com indivíduos em risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares com outras comorbidades (como diabetes, tabagismo, dislipidemia ou obesidade) demonstraram que há melhora da capacidade antioxidante plasmática após o consumo de alimentos da dieta mediterrânea, como mix de nozes e castanhas e azeite de oliva (HUANG; SUMPIO, 2008; SHEN *et al.*, 2015). Correlacionado a esses dados, estudos também

demonstraram uma diminuição de dano a DNA induzido por antioxidantes quando em uso de dieta mediterrânea (BO' *et al.*, 2019). Além disso, estudos *ex vivo* demonstraram que a adesão à dieta mediterrânea tende a melhorar o status geral de saúde, o tamanho dos telômeros e a aumentar a atividade da telomerase em pessoas idosas (BOCCARDI *et al.*, 2013).

4.4 Ovário, dieta e estresse oxidativo

O consumo de dietas contendo alto conteúdo de carboidratos é uma das causas potenciais mais investigadas relacionadas à fisiologia ovariana e estresse oxidativo. Atualmente, já é sabido que oxidantes, como peróxido de hidrogênio, e defesas antioxidantes enzimáticas, como as enzimas SOD e CAT, têm papel essencial na produção de hormônios esteroides, ovulação e implantação embrionária (RIZZO *et al.*, 2012). Mesmo com um papel ativo em processos fisiológicos, já foi observado que alterações no balanço oxidativo podem levar à patogênese de doenças do sistema reprodutor feminino, como: endometriose, anovulação, infertilidade sem causa aparente e prejuízo à qualidade oocitária (AGARWAL *et al.*, 2012). Akamine *et al.* (2010) demonstraram que uma dieta com alto conteúdo de gordura promoveu alteração do ciclo estral de ratas Wistar a partir de 120 dias de administração da dieta, porém com efeitos mais acentuados após 180 dias de consumo, podendo resultar em diminuição da capacidade reprodutiva. Sadowska *et al.* (2019) hipotetizaram que distúrbios no metabolismo de carboidratos e lipídeos poderiam levar a alterações no sistema antioxidante no ovário e útero de ratas Wistar. Utilizando uma dieta com 18% da energia total proveniente da sacarose por 8 semanas, o grupo observou aumento nas atividades de CAT e GPx no plasma dos animais (SADOWSKA *et al.*, 2019). A alteração sistêmica causada pela dieta ocorreria devido à razão entre as isoformas dos receptores de estrógenos, corroborada por outros grupos que demonstraram que as isoformas predominantes de cada tecido determinam a predisposição ao estresse oxidativo (NADAL-SERRANO *et al.*, 2013; PONS *et al.*, 2014). Em pesquisa com camundongos, já foi observada disfunção mitocondrial, resistência à insulina I e influência sobre gordura corporal quando ocorre remoção das gônadas ou depleção da via da aromatase (responsável pela síntese de E2); tais efeitos são revertidos pela suplementação de estrógenos, impedindo o aparecimento de síndromes metabólicas

associadas (CAMPOREZ *et al.*, 2013; JELENIK; RODEN, 2013; MAUVAIS-JARVIS, 2011; NEMOTO *et al.*, 2000).

Pesquisadores hipotetizam relação direta entre o aumento da massa corporal e a concentração de estrógenos, e que, quando associados à obesidade, estrógenos em excesso podem ser causa de anovulação pelo bloqueio da liberação de FSH durante o ciclo menstrual (VARLAMOV, 2017). Como mencionado anteriormente, alterações na via de produção de estrógenos ou remoção dos tecidos associados podem levar a distúrbios sistêmicos, que podem ser associadas também ao estilo de vida (BAIRD *et al.*, 2006).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Tem-se como objetivo avaliar o efeito do exercício físico de natação com sobrecarga durante o período gestacional sobre o estado redox, vias de sinalização associadas e histologia dos ovários da prole submetida a uma dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar durante 10 semanas na vida adulta.

5.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho: (1) avaliar o ganho de peso das mães submetidas ao exercício físico de natação com sobrecarga durante o protocolo de intervenção; (2) avaliar parâmetros pós-natais das filhotes fêmeas submetidas ao consumo de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar por 10 semanas. Os parâmetros avaliados foram: (a) o ganho de peso corpóreo dos filhotes durante a duração do protocolo de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar; e (b) análise histopatológica dos folículos ovarianos dos animais, nomeadamente: número de folículos primordiais, primários, secundários, antrais, atresicos e corpo lúteo; (3) determinar parâmetros de homeostase redox em ovários de filhotes fêmeas que consumiram dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar previamente submetidas à natação com sobrecarga como intervenção de exercício físico durante o período gestacional. Os parâmetros avaliados foram: (a) a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GLO I e razão SOD/(GPx+CAT), (b) concentração de glutathiona reduzida (GSH), e (c) os níveis de dano proteico; (4) verificar o imunoc conteúdo de vias moleculares relacionadas ao exercício físico e à dieta, como: (a) o imunoc conteúdo total de Mfn-1, (b) o imunoc conteúdo total de AMPK e imunoc conteúdo de sua forma fosforilada, pAMPK, (c) o imunoc conteúdo total de FOXO3a e de sua forma fosforilada, pFOXO3a, (d) o imunoc conteúdo total de beta-actina.

PARTE II – DADOS EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico: *Maternal swimming with overload followed by postnatal high-fat, high-sugar diet leads to mild impairment on offspring's ovarian redox homeostasis*

Autores: Bárbara Mariño Dal Magro, Bernardo Gindri dos Santos, Pauline Maciel August, Manuela Menegotto, David Dreimeier e Cristiane Matté.

A ser submetido à revista científica: *Journal Of Ovarian Research* (Classificação “B1” segundo Classificações do Quadriênio 2013-2016, Plataforma Sucupira, CAPES).

Regras de publicação da revista selecionada: ver Anexo B.

Maternal swimming with overload followed by postnatal high-fat, high-sugar diet leads to mild impairment on offspring's ovarian redox homeostasis

Dal Magro, B. M.¹, dos Santos, B. G.¹, August, P. M.², Menegotto, M.²

Dreimeier, D.³, Matté, C^{1,2,4,5}.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Setor de Anatomia Patológica Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Corresponding author. E-mail: matte@ufrgs.br

Corresponding author: Cristiane Matté, PhD, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo (laboratório 23), CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: +55 51 3308 5548, Fax: +55 51 3308 5535, e-mail: matte@ufrgs.br.

Abstract

According to the developmental origins of health and disease (DOHaD) hypothesis, early life interventions can play a life-long role on the health of the offspring. Since the DOHaD concept establishes the pregnancy and surrounding periods as critical programming windows, many studies indicate that the practice of physical exercise and the consumption of balanced diets can have positive effects on the offspring overall health. Concerning transgenerational effects, research has demonstrated the influence of intrauterine interventions on offspring reproductive health. This study assessed the effects of maternal swimming (2% overload) one week prior and during all pregnancy followed by a postnatal high-fat, high-sugar (HFHS) diet consumption for 10 weeks, on the ovaries of female adult Wistar rats. We evaluated offspring's bodyweight, histomorphological ovarian markers, the antioxidant network, the protein oxidation status, and related molecular pathways, such as of mitofusin-1, FOXO3a and AMPK immunocontents. Our study demonstrated that the offspring born to exercised dams demonstrate a 2-week delay in weight gain when compared to sedentary-born animals, demonstrating a positive protective effect of swimming during pregnancy. Animals from all groups displayed normal morphological characteristics of all follicle types and mild morphological alterations, such as vacuolization and blood infiltrates in ovarian cortex. Concerning the combination of pre and postnatal protocols, there is mild statistical interaction in the parameters evaluated. In relation to each intervention alone, the maternal exercise protocol (with overload) led to a reduction of both the SOD activity, with or without the postnatal diet intervention, and of a known index of cellular oxidative stress, also reducing mitofusin-1 immunocontent. On the other hand, the postnatal high-fat, high-sugar diet alone led to diminished SOD and GPx activities, and increased the pFOXO3a/FOXO3a ratio in the offspring ovaries. This study is the first to assess redox network and molecular pathways in offspring ovaries subjected to both pre and postnatal interventions, suggesting that maternal swimming with 2% bodyweight overload combined with HFHS diet during postnatal life leads to harmful effects on the ovarian redox network of offspring.

1. Background

The obesity index has been increasing in alarm levels since the 1970's [1]. The excessive weight gain develops from a chronic state of high energy intake, which leads to triglyceride accumulation on adipose tissue [2], worsened by genetic, epigenetic, and lifestyle factors [3,4]. These new unhealthy habits raise concern regarding future generations, once it has been already demonstrated that one's lifestyle can influence offspring and later generations [5].

The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) dates from 1986, when David Barker and colleagues first described the association between undernutrition before birth and early death, wondering if early life nutritional adversities were linked to higher cardiovascular diseases mortality later in life [6,7]. The so-called "Barker Hypothesis" developed in the following years, reporting the effects of early undernutrition and several non-communicable diseases on adulthood [8–12]. Recently, David Barker's hypothesis was expanded into the DOHaD concept, including a more comprehensive approach regarding early life interventions and their effects on the offspring [7].

Research on dietary alterations demonstrated that the DOHaD concept can be expanded not only to the reproductive function of the first offspring, but to the generations that follow [13,14], as nutritional interventions lead to altered gametogenesis and reproductive dysfunctions in later life [15]. In that same direction, Akamine et al. observed alterations on rat estrous cycle after 120 days of high-fat diet administration, possible reduction of reproductive capabilities, and appearance of ovarian insulin resistance [16]. Other studies already demonstrated that gestational dietary interventions can cause ovarian alterations as soon as the fourth postnatal day [15]. In gestational models of diet-induced obesity, the animals present early puberty

development [17], and the maternal adiposity index can be correlated to a diminished oocyte count of the offspring [18].

Concerning the intrauterine development period, it is already known that healthy pregnancies, with the association of balanced diet and physical practice, lead to many benefits for both the mother and the newborn [19,20]. Studies with physical exercise have already demonstrated favourable metabolic programming, protecting the offspring from some metabolic diseases [21], leading to benefits to mother and infant [22]. Our research group has already demonstrated that swimming exercise before and during pregnancy does not alter physical and developmental characteristics of the offspring soon after birth [23], promotes enhancement in the brain antioxidant defenses of dams and pups [24,25], and is capable of protecting the offspring against damage induced by obesogenic diet in adulthood [26]. Oxidative stress is a known unbalance between the production of oxidants and its scavenging antioxidant molecules, that can be both enzymatic or non-enzymatic in nature. Oxidative stress levels and their harmful effects are linked to high intensity exercise or sedentary behaviour, where moderated and regular exercise modalities are correlated to low levels of oxidative stress.

Vis-à-vis, Vega et al. already demonstrated that the negative effects of gestational high-fat diet can be reversed by the practice of physical exercise during intrauterine development [22]. Regarding physical exercise during pregnancy, and offspring ovaries, there are few studies on the subject. On porcine models, Kaminski et al. demonstrated that the adolescent offspring of dams who sustained walks as a physical exercise during pregnancy had a higher index of proliferative ovarian cells [27].

Due to possible positive effects of gestational physical exercise based on the studies of our group, we wondered if swimming during pregnancy (with 2% overload)

could be a suitable approach to modulate the effects of high-fat, high-sugar (HFHS) diet on offspring ovarian parameters such as morphology, antioxidant defense system, and correlated signalling pathways in the offspring.

2. Experimental procedures

2.1. Animals and reagents

Forty-eight adult female Wistar rats (120 days old, nulliparous) were mated with 24 males (ratio two females to one male). All animals were obtained from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at the Federal University of Rio Grande do Sul. Rats were maintained on a 12-h light-dark cycle at constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. After mating, female rats were housed in groups of three per cage, and randomly divided into two groups: a control group and a maternal swimming exercise with overload group.

The study procedures were approved by a local ethics committee (Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Permit n°36716), and the study was performed in accordance with the national animal rights regulation of Brazil (Law 11.794/2008), with the National Council of Control on Animal Experimentation (CONCEA, Brazil) on euthanasia guidelines, with the National Institutes of Health's (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [28], and with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) [29]. All efforts were made to minimize the suffering of the animals used.

The chemicals used in this study were obtained from Sigma Chemical, Invitrogen, Abcam, Cell Signalling Technology, and Thermo Fischer Scientific.

2.2. Experimental design

Female rats were randomly divided into one of the following groups (n= 24 each): 1) sedentary rats; or 2) swimming exercised rats with overload (2% body weight). Maternal exercise began one week previous to mating, to adapt the animals to the aquatic environment. During the exercise protocol, four animals were kept in each cage, except for mating (one male per two female rats). Pregnancy was diagnosed by the presence of a vaginal plug, and 18 animals from each group were found to be pregnant. From the 20th day after the onset of pregnancy, we isolated the pregnant dams (one per cage), and the rats were observed twice a day (at 9 a.m. and 4 p.m.), to verify the litter's birth. The day corresponding to the offspring's birth is defined as postnatal day 0 (PD0). Within 24 h after delivery, the litter was adjusted to a number of eight pups per dam. From PND 0 until litter weaning (PND 21), the pups were maintained with their dams.

2.3. Swimming exercise protocol

Adult female rats were divided into two groups: (1) sedentary control dams, and (2) maternal swimming exercise dams (with 2% of body weight overload). The animals from the swimming group underwent involuntary swimming exercise for 30 min per day (performed between 2 and 7 p.m.), 5 days/week, for 4 weeks (first week for adaptation prior to mating and the three remaining weeks during the entire pregnancy period) (Figure 1A), as previously described [24]. The swimming pool (30 width x 30 length x 90 depth cm) was filled with water at $32 \pm 1^\circ\text{C}$, to ensure thermal comfort during exercise. The rats were stimulated with overload (2% body weight attached to the tail), adapted from Wasinski et al. [30] and Chinkin [31]. As previously described by August et al. [26], the 2% overload was used from day 2 to 5 of swimming adaptation and throughout pregnancy, except in the first two days after pregnancy detection, when the animals swam without the extra weight. The swimming animals' group was left free to

swim and was gently stimulated if necessary. After all animals swam, control rats were immersed in water for 10 s, to be exposed to aquatic environment, carefully dried, and returned to housing boxes. This swimming protocol is considered to be as of moderate intensity.

2.4. High-Fat, High-Sugar (HFHS) Diet

At weaning (PND 21), up to 2 female pups per dam were randomly assigned to either the control group or HFHS diet according to the maternal protocol, as follows: (1) sedentary dam + postnatal control diet (Sedentary) (n = 20), (2) sedentary dam + postnatal HFHS diet (Sedentary + HFHS) (n = 20), (3) exercised dam + postnatal control diet (Exercise) (n = 21), and (4) exercised dam + postnatal HFHS diet (Exercise + HFHS) (n = 21). Groups 1 and 3 had *ad libitum* access to water and standard rat chow. Groups 2 and 4 had *ad libitum* access to water, a 32% sucrose solution, and a high-fat diet (60% of calories derived from fat), as described by Roberts et al. and Volk et al. [32,33]. The animals were housed in three to four per cage. Animals were weighted and handled three times per week. Food intake was estimated by weighting leftover feed. The diets were carried out for 10 weeks, from PND 21 to PND 90 (Figure 1B). In the tenth week of protocol, estrous cycle was monitored by vaginal smearing to ensure that all animals were on estrous day when euthanised by decapitation around PND 90 (between PND 90 and PND 92). Both ovaries were removed and prepared as follows.

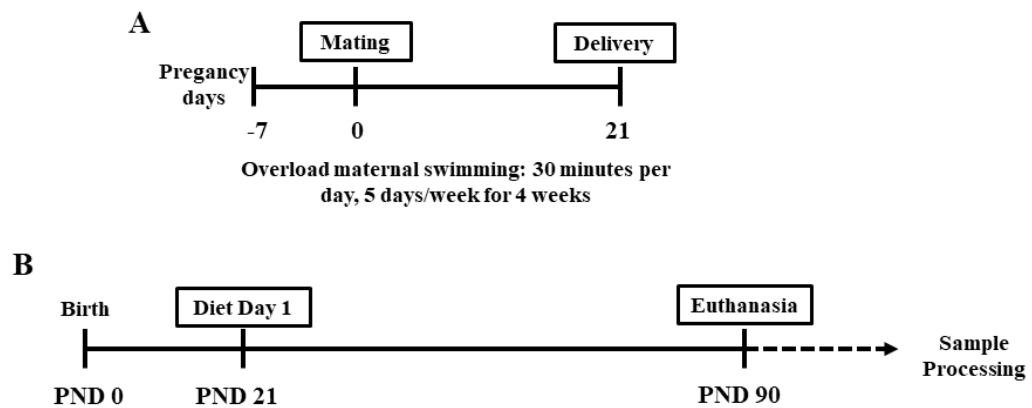


Figure 1: Experimental design for (A) maternal swimming, and (B) diet protocol from PND21 to PND 90.

2.5. Histopathological evaluation

Ovaries were obtained from pups euthanised on PND 90-92 and were embedded in 10% buffered formalin. The tissues were paraffinized, sectioned (5 mm) and stained with haematoxylin and eosin for general histomorphology evaluation.

Ovarian follicles were classified according to the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines, as follows: primordial follicles (oocyte surrounded by a simple squamous epithelium), primary follicles (oocyte surrounded by a single layer of columnar cells), secondary follicles (oocyte surrounded by multi-layered granulosa cells), antral follicle (oocyte surrounded by a large central cavity filled with fluid and surrounded by multi-layered granulosa cells), atretic follicles (apoptotic and pyknotic nuclei and nuclear debris on a degenerated zone of granulosa cells), and corporea lutea (eosinophilic structure without oocyte on the ovarian surface) [34].

2.6. Sample processing for biochemical analysis of redox status

Ovaries were homogenised in 10 volumes (1: 10 w/v) of PBS, pH 7.4, containing 1 mM EGTA and 1 mM Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF). Homogenates were

centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4 °C to remove nuclei and cell debris. After centrifugation, the supernatant was used in biochemical assays of enzyme and non-enzyme antioxidants, described below.

2.7. Antioxidant system

2.7.1. Superoxide dismutase. The activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed according to Misra and Fridovich [35]. Total SOD activity was measured by the quantification of the inhibition of superoxide-dependent adrenaline autoxidation measured at 480 nm in a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). SOD activity is expressed in units per milligram protein, in which 1 unit is the amount of enzyme that inhibits the oxidation of adrenaline by 50%.

2.7.2. Catalase. The activity of catalase (CAT; EC 1.11.1.6) was measured according to the methods of Aebi [36]. The reaction is catalysed in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100 and 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, measured by the decrease of absorbance at 240 nm using a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). CAT activity is expressed in units per milligram protein, in which 1 unit is defined as that required to degrade 1 mmol H₂O₂ per minute.

2.7.3. Glutathione peroxidase. The activity of glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) was assayed according to Wendel [37]. The disappearance of NADPH was monitored at 340 nm on a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). The reaction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.7, 1 mM EDTA, 2mM GSH, 0.015U mL glutathione reductase (EC 1.8.1.7), 0.4 mM azide, 0.1 mM NADPH, and 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide as the enzyme substrate. In this study, GPx activity is expressed in units per milligram protein, in which 1 unit is defined as that necessary to catalyse 1 mmol NADPH degradation per minute.

2.7.4. Glyoxalase-I. The activity of glyoxalase-I (GLO I; EC 4.4.1.5) was measured as described previously by Thornalley and Tisdale [38]. Briefly, the formation of S-D-lactoylglutathione was monitored at 240 nm using a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices) in a reaction medium containing 4 mM GSH and 4 mM methylglyoxal (MG) in a 60 mM potassium phosphate buffer, pH 6.6. One unit of GLO I activity was defined as the amount of enzyme catalysing the formation of 1 mmol S-D-lactoylglutathione per minute.

2.7.5. Reduced glutathione concentration. GSH levels were measured in accordance with Browne and Armstrong [39]. In this study, the proteins in the supernatant were initially precipitated with meta-phosphoric acid (1: 1 v/v) and then centrifuged at 5000 x g for 10 min at 25 °C. Then, 42 uL of supernatant were incubated with 154.2 uL of reaction medium containing 120 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, and 5 mM EDTA at room temperature for 15 min. A blank was prepared in parallel. The protocol aimed to measure the reaction of GSH with fluorophore o-phthalaldehyde by fluorescence at excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was prepared using standard GSH (0.01 to 1 mM). Concentrations of GSH are reported as nanomole per milligram protein.

2.7.6. Carbonyl levels. Protein carbonyl levels were assayed based on the reaction of carbonyl with dinitrophenylhydrazine (DNPH), forming a yellow compound with absorbance measured at 370 nm. The carbonyl levels are a marker of protein oxidative damage, as described by Reznick and Packer [40]. For this assay, 1 mg protein sample was treated with 20% trichloroacetic acid and centrifuged at 4000 x g for 5 min at 4 °C. The pellet obtained was dissolved in 0.2 M NaOH, after which 10 mM DNPH, prepared in 2 M HCl, were added. The samples were kept in the dark for 1h and vortexed every 15 min intervals until centrifugation at 20,000 x g for 5 min at 4 °C.

The supernatant was discarded, and the pellet washed three times with ethanol:ethyl acetate (1:1 v/v), being centrifuged again between washes at 20,000 x g for 5 min at 4 °C. The final supernatant was discarded, and the pellet washed in 8 M urea pH 2.3 at 60 °C. After that, the samples were centrifuged once again at 20,000 x g for 5 min at 4 °C, and had their absorbance measured at 370 nm in a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). Protein carbonyl content is expressed as nanomole per milligram of protein.

2.8. Western blot analysis

Ovaries obtained from pups on PND 90 were homogenised in ice-cold lysis buffer containing 4% sodium dodecyl sulphate (SDS), 2 mM EDTA, 50 mM Tris, and 1% protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4 °C to remove nuclei and cell debris. To the supernatant was added 1 part of Laemmli buffer (2x Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD, #161-0737). Samples were then stored at -80 °C until use. Equal concentrations of protein (50 ug) were fractionated using a 7.5% SDS-PAGE gel immersed in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS running buffer, and were then transferred (25 mM Tris, 192 mM glycine, 12,5% v/v ethanol blotting buffer) to a PVDF membrane (Millipore, USA). Membranes were washed 5 times in TBST (Tris-Buffered Saline, 0.1 % Tween) and were then incubated for 60 min at 4 °C in M-TBST blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% non-fat milk and 0.1% Tween-20, pH 7.4). After blocking, membranes were incubated overnight at 4 °C in M-TBST blocking solution containing one of the following primary rabbit monoclonal antibodies: anti-AMPK α (1:1000, Cell Signaling, catalog number #2532), anti-Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) (1:1000, Cell Signaling, catalog number #2535), anti-FoxO3a (75D8) (1:1000, Cell Signaling, catalog number #2497), anti-Phospho-FoxO3a (Ser253) (D18H8) (1:1000, Cell Signaling, catalog number #13129),

anti-Mfn-1 (1:1000, Abcam, catalog number #ab104274), and rabbit monoclonal anti- β -actin (1:2000, Cell Signaling, catalog number #4967). Membranes were then washed with TBST and incubated with secondary antibody containing peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:3000, GE Healthcare Life Sciences, catalog number #NA934V) for one hour and a half at room temperature. Chemiluminescence was detected using a digital imaging system (Image Quant LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences) and analysed using ImageJ (National Institutes of Health). The mean optical density for the control group was set to 100%.

2.9. Protein concentration

Protein concentrations were measured according to the modified Lowry's method as described by Peterson et al. [41], using bovine serum albumin as the standard.

2.10. Statistical analysis

GraphPad Prism 9.0 software was used for data analysis. The data distribution was assessed with the Shapiro-Wilk test. Parameters with normal distribution were analysed by the two-way analysis of variance (ANOVA), with maternal swimming exercise and the diet type as the two main independent factors. The ANOVA tests were followed by Tukey's multiple comparison test when interactions were statistically significant. Parameters with non-normal distribution were analysed by Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance (ANOVA), followed by Dunn's test. Body weight recordings throughout the 10 weeks were analysed by repeated measures two-way ANOVA. All data were expressed as \pm S.E.M. Statistical significance was achieved at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Maternal swimming exercise with overload prevented HFHS diet induced weight gain until 8 weeks of diet consumption, but not later

Animals from the Sedentary + HFHS diet group had significant weight gain starting after 6 weeks of HFHS diet when compared to the Sedentary animals (Figure 2). Such weight gain was consistent from week 6 ($p = 0.003$), throughout week 7 ($p = 0.0089$), week 8 ($p < 0.0001$), week 9 ($p < 0.0001$), and week 10 ($p < 0.0001$) of the postnatal diet protocol. The maternal swimming group did not present significant weight gain from week 1 to week 8. The offspring exposed to maternal swimming exercise + HFHS diet presented increased weight gain when the group was compared to the Exercise group starting at 8 weeks of postnatal diet intervention ($p < 0.0001$) (Figure 2), persisting on week 9 ($p < 0.0001$) and week 10 ($p < 0.0001$) of the diet administration. Overall, we demonstrated that animals delivered to exercised dams present a two-week weight gain delay when compared to animals born to sedentary dams.

Animals from all groups displayed normal morphological variations of all follicle types and mild morphological alterations, such as vacuolization and blood infiltrates in ovarian cortex (data not shown). Despite that, pre and postnatal treatments did not elicit any significant effect on ovarian follicle morphology of 90-days-old animals subjected to intrauterine swimming exercise with overload and postnatal HFHS diet (data not shown).

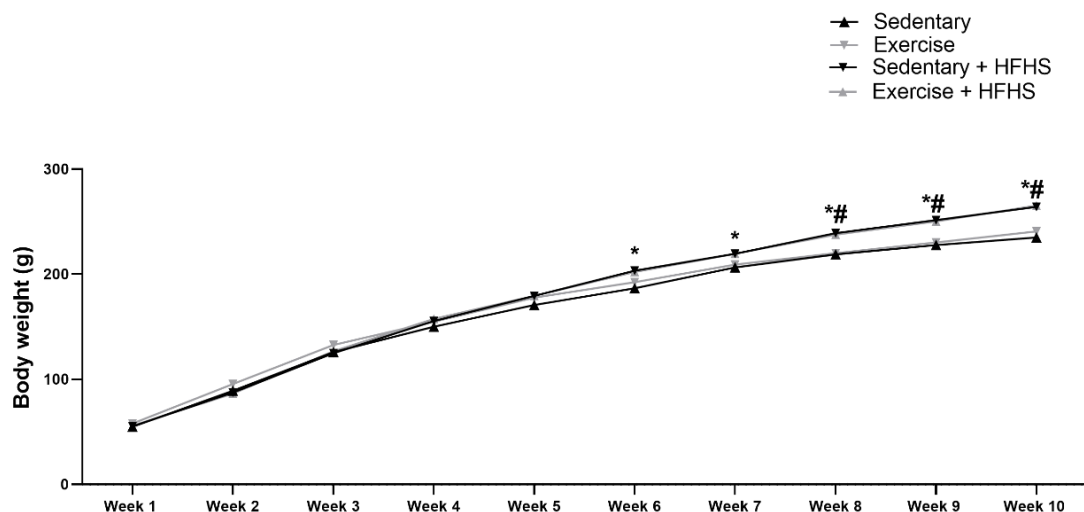


Figure 2: Offspring body weight (g) from weaning (week 1) to 90 days of age (week 10). Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 26-30$. Data were analysed by repeated measures two-way ANOVA. Hashes on bars represent only a maternal swimming exercise effect, and the asterisks represent only a diet effect.

3.2. Offspring's ovaries presented diminished activities of antioxidant enzymes related mostly to HFHS diet consumption

The effect of maternal and postnatal interventions on ovarian antioxidant defenses is shown in Figure 3. SOD activity was not affected by the interventions – overloaded maternal swimming and postnatal diet - when applied together [$F(1,23)=0.06317, p=0.8038$]. Although there was no interaction between treatments, we observed reduced enzymatic activity caused by maternal swimming exercise with overload [$F(1,23)=18.35, p=0.0003$] and postnatal diet [$F(1,23)=6.222, p=0.0202$] when these factors are analysed isolated (Figure 3A). GPx activity was reduced by the HFHS diet intervention isolated [$F(3,22)=15.01, p<0.0001$], whereas maternal swimming did not elicit any protective effect (Figure 3B). The activities of CAT and GLO I enzymes were not altered neither by the interaction of pre and/or postnatal interventions nor by

the treatments alone [$F(1,24)=1.388, p=0.0.2503$ and $F(1,28)=1.669, p=0.2070$, respectively] (Figure 3C and 3E, respectively). Although maternal exercise and postnatal diet did not elicit any interaction effects on the SOD/(GPX+CAT) ratio [$F(1,20)=1.551, p=0.2273$], the prenatal exercise intervention was able to reduce SOD/(GPx+CAT) ratio in the exercised group when compared to the sedentary group [$F(1,20)=14.59, p=0.0011$] (Figure 3D), whilst the postnatal dietary treatment did not elicit any effects [$F(1,20)=2.278, p=0.1469$]. As for the non-enzymatic antioxidant defenses, the levels of GSH were not altered by maternal or postnatal interventions, alone or combined [$F(3,23)=0.2281, p=0.8758$] (Figure 3F).

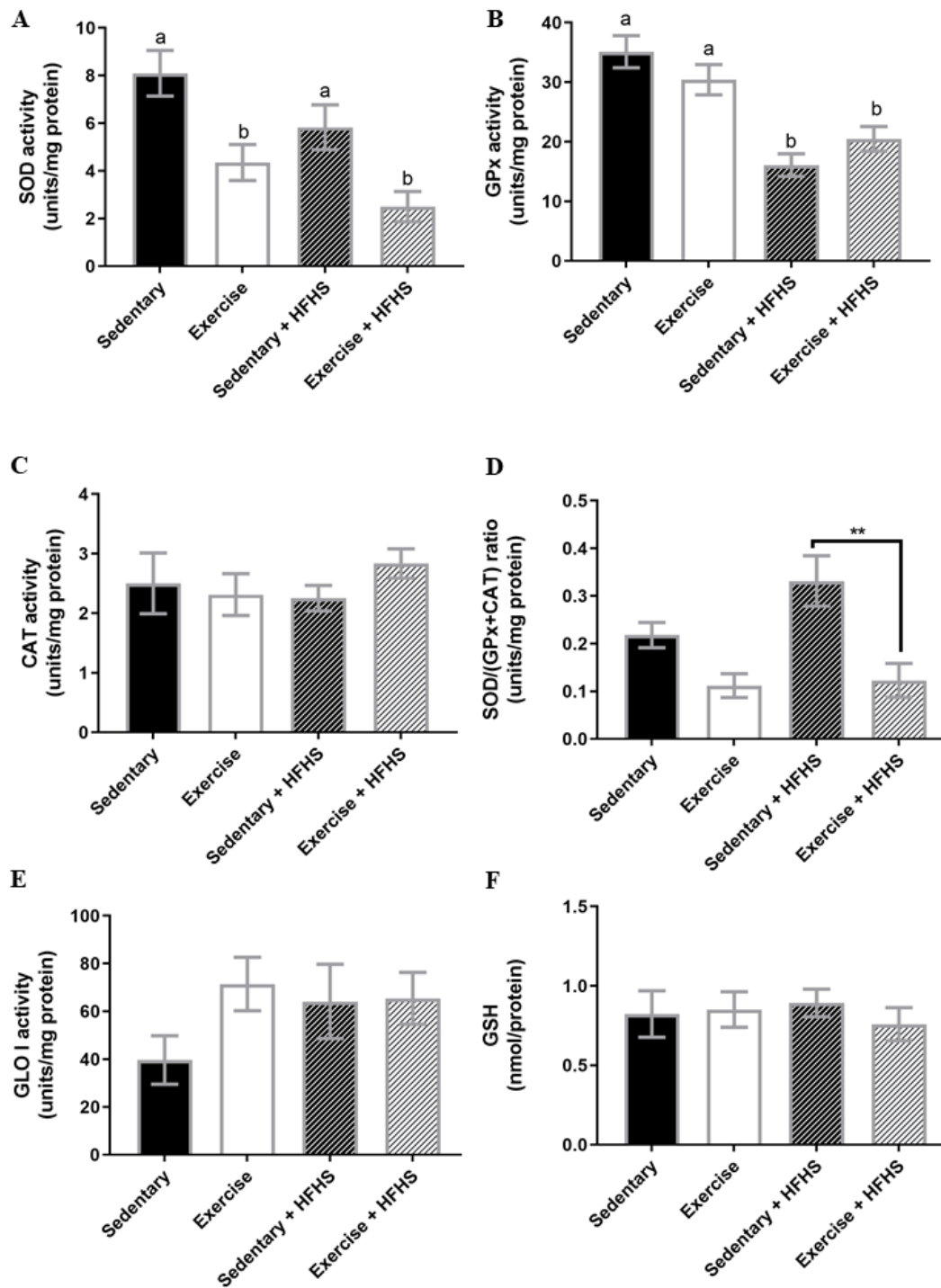


Figure 3: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on offspring ovaries at 90 days of age. (A) SOD activity, (B) GPx activity, (C) CAT activity, (D) SOD/(GPx+CAT) ratio, (E) GLO I activity, and (F) GSH levels. Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 5-8$. ** for $p < 0.01$. Data were analysed by two-way ANOVA

followed by Tukey's post-test or Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA, followed by Dunn's test. Different from all groups, $a \neq b$, $p < 0.05$.

Regarding carbonyl levels, neither maternal exercise with overload nor postnatal HFHS diet elicited any significant statistical alteration in protein oxidation in the offspring's ovaries at 90 days of age [$F(3,26)=1.817, p=0.1688$] (Figure 4).

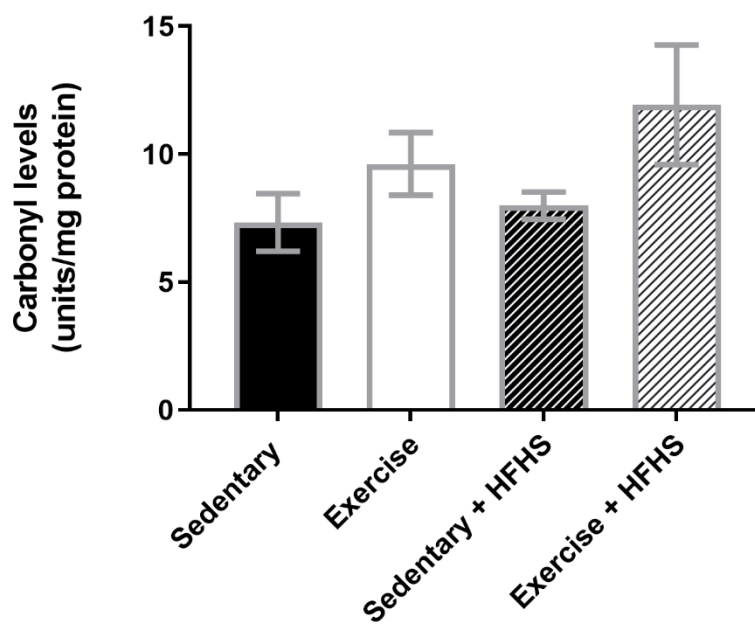


Figure 4: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on carbonyl levels of offspring ovaries at 90 days of age. Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 7-8$. Data were analysed by Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA, followed by Dunn's test.

3.3. Maternal swimming exercise with overload diminished mitofusin-1 immunocontent in offspring ovaries

The combination of pre and postnatal interventions did not cause any significant alterations to the mitofusin-1 immunocontent in the ovaries of the offspring [$F(1,19)=0.3158, p=0.5158$]. Maternal swimming with overload during intrauterine development diminished the mitofusin-1 immunocontent [$F(1,19)=5.101, p=0.0359$],

while postnatal diet alone did not elicit any significant change in the mitofusin-1 immunocontent of the same tissue [$F(1,19)=0.3875, p=0.5140$] (Figure 5).

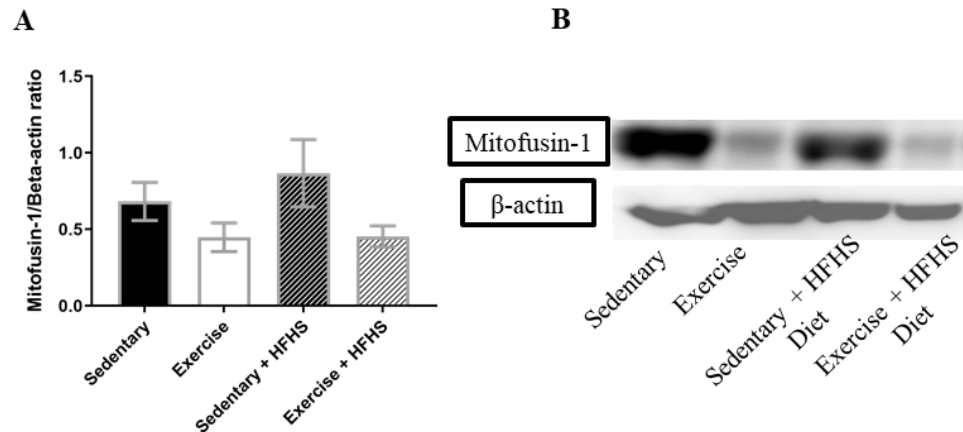


Figure 5: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on (A) mitofusin-1 immunocontent in offspring ovaries at 90 days of age, and (B) immunoblotting for mitofusin-1 and β -actin for each intervention group. Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 5-6$. Data were analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

3.4. Maternal swimming exercise with overload and HFHS diet did not lead to significant alterations regarding FOXO3a and pFOXO3a immunocontents, eliciting only an enhancement of the pFOXO3a/FOXO3a ratio

Neither maternal swimming exercise with overload nor postnatal HFHS diet [$F(3,19)=1.014, p=0.4084$] and [$F(3,19)=2.063, p=0.1392$] altered the total FOXO3a and pFOXO3A immunocontents (Figure 6A and 6B, respectively). The pFOXO3a/FOXO3a ratio was increased, as shown by the Kruskal-Wallis test [$F(3,16)=4.067, p=0.0252$], although neither group was altered in the post-hoc test (Figure 6C).

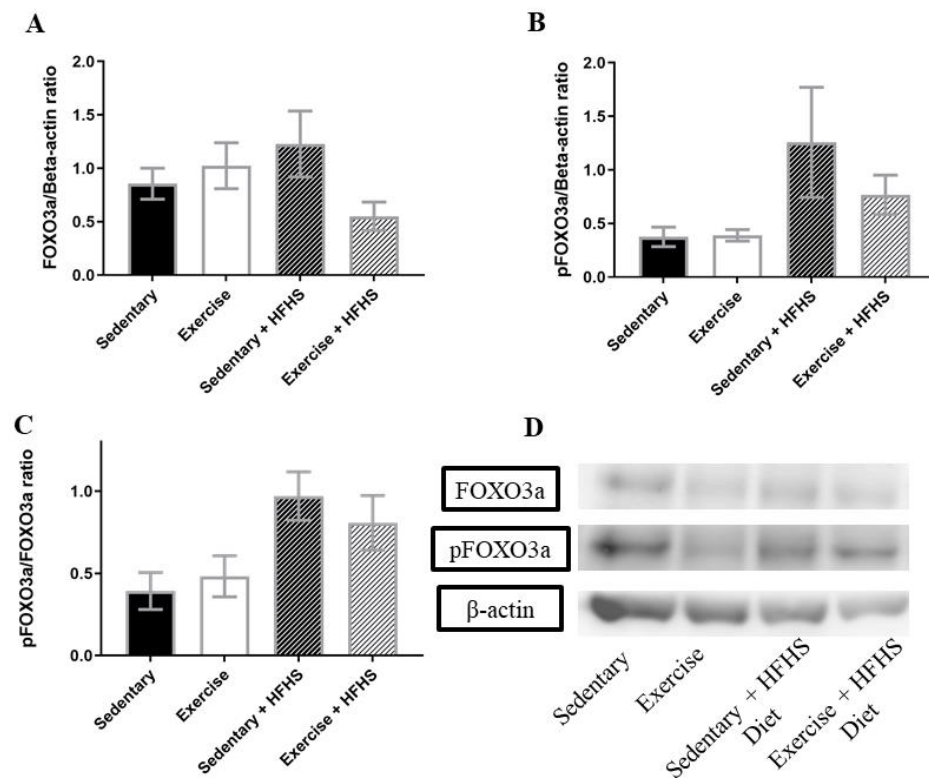


Figure 6: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on (A) FOXO3a immunocent, (B) pFOXO3a immunocent, (C) pFOXO3a/FOXO3a immunocent ratio in offspring ovaries at 90 days of age, and on (D) immunoblotting for FOXO3a, pFOXO3a and β -actin for each intervention group. Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 5-6$. Data were analysed by Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA, followed by Dunn's test.

3.5. Maternal swimming exercise with overload and HFHS diet did not lead to significant alterations regarding AMPK and pAMPK immunocentents

The pAMPK immunocent was not altered by the interaction of pre and postnatal treatments [$F(1,19)=0.7573, p=0.3950$] (Figure 7A). Concerning the non-phosphorylated form, the expression of the total AMPK immunocent followed the same pattern as the phosphorylated form, not being altered by the interaction of

treatments [$F(1,20)=0.002052, p=0.9643$] (Figure 7B). The pAMPK/AMPK ratio did not present any alteration when each treatment was evaluated alone or allied [$F(1,18)=4.380, p=0.0508$] (Figure 7C).

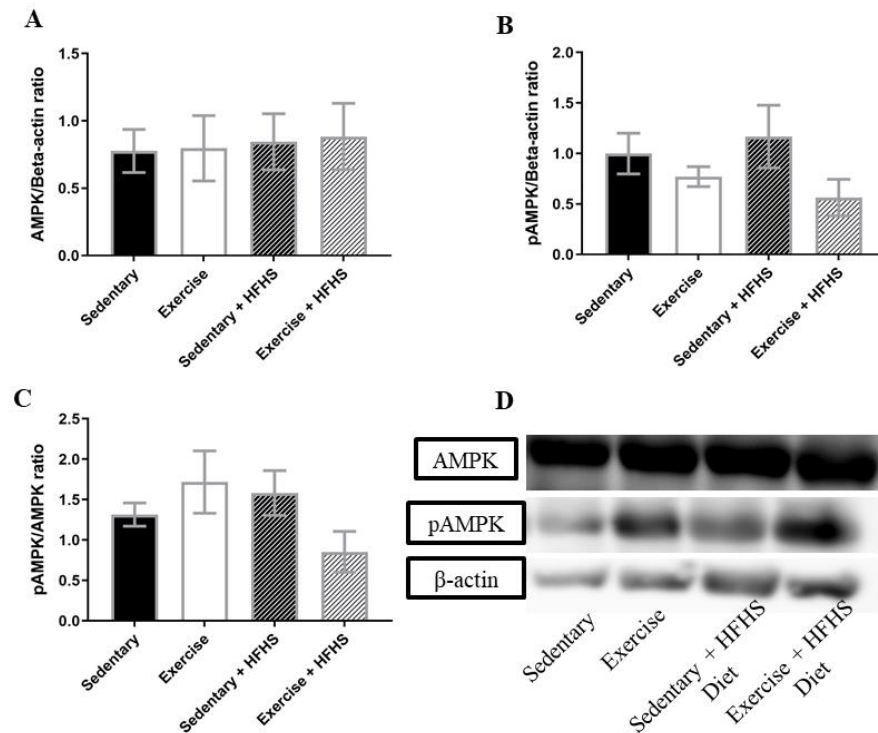


Figure 7: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on (A) AMPK immunoccontent, (B) pAMPK immunoccontent, and (C) pAMPK/AMPK immunoccontent ratio in offspring ovaries at 90 days of age, and on (D) immunoblotting for AMPK, pAMPK, and β -actin for each intervention group. Data are expressed as mean \pm SEM for $n = 5-6$. Data were analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

4. Discussion

The present study aimed to verify the effects of swimming exercise with overload during intrauterine development on adult offspring ovaries when challenged by an obesogenic HFHS diet from weaning throughout early adulthood. It is already stated that the periconceptual period is a critical window regarding the offspring's future [15,42], as the lifestyle alterations during development could lead to many

benefits [23,24,26,43–45] or cause enormous harm [7,15,42,46]. Although overloaded maternal swimming did not prevent weight gain throughout the full HFHS diet administration protocol, it was able to delay an overall weight gain in two weeks when compared to animals born from sedentary mothers.

The combination of pre and postnatal interventions did not lead to any changes to the morphological architecture of ovarian follicles, although we did find some abnormal characteristics, such as blood infiltrates and lipid droplets in all the pre or postnatal intervention groups. Similarly, in a study conducted by Akamine et al., Wistar rats, aged 8-10 weeks old, were subjected to 120 or 180 days of a high-fat diet and presented abnormal vacuolization and lipid droplets [16], demonstrating the effects of a high-fat diet, however not reaching statistical significance. Unfortunately, we were not able to assess estrous cycle and initiation of sexual maturation throughout the ten-week protocol of diet administration. However, literature brings some insights in this topic. It has been demonstrated that Wistar rats that underwent a 25% high sucrose diet display signs of early puberty, in a full 2.5 days prior to animals consuming control diets [47]. The same study also showed that the 25% sugar diet led to a higher number of atretic follicles, a damage that our 60% fat and 32% sugar diet did not induce.

To our knowledge, there are no studies demonstrating the effects of overloaded maternal swimming and postnatal obesogenic diet on antioxidant network activity in offspring ovaries. Regarding redox homeostasis and antioxidant network modifications, here we demonstrate that overloaded maternal swimming exercise intervention, before and during pregnancy, followed by a postnatal obesogenic diet treatment for ten weeks tend to affect these parameters when isolated. The present study evaluated the antioxidant enzymes activities in the offspring's ovaries, and demonstrated that SOD activity was diminished by overloaded maternal exercise,

alone or allied to HFHS diet, whereas the GPx activity was reduced only by the HFHS diet. Falone et al. have already demonstrated that both SOD and GPx activities are enhanced in the ovaries of adult animals subjected to two or four weeks of treadmill running [48]. Concerning the obesogenic diet, Sadowska et al. already demonstrated that a 16% sucrose diet can lead to diminished ovarian SOD activity without impacting GPx activity levels [49], whereas Yan et al. demonstrated that offspring's consumption of a high-fat diet after maternal control diet leads to increased SOD activity in the ovaries of the offspring [50]. Regarding the SOD/(GPx+CAT) ratio, a known index of cellular oxidative stress [51], we found a reduction in the group exercised allied to diet, when compared to diet alone. As a result, we hypothesize that there is a higher production of reactive oxygen species that are not being scavenged by its detoxifying enzymes. The balance between SOD and CAT or GPx can affect cellular sensitivity to oxidative stress, in which even small perturbations lead to major effects and to the establishment of a pro-oxidant cellular condition, already demonstrated by several research groups [52–54]. Since the activities of antioxidant enzymes such as SOD and GPx, among others, are essential to enhance steroidogenesis, ovulation, and implantation [55,56], we hypothesize that the animals from this study are in a state of early ovarian damage, despite the absence of protein damage, as the interventions administered led to a mild decrease in the antioxidant defense system capacities.

Although others have already demonstrated that CAT and GLO I can be positively affected in ovaries of animals exposed to treadmill exercise [48], neither enzymatic activities were altered by swimming exercise with overload and/or postnatal obesogenic diet. Concerning non-enzymatic antioxidant levels and carbonyl levels, an index of damage to proteins, neither pre nor postnatal treatments elicited any effect on

the GSH or carbonyl levels of animals subjected to overload maternal swimming and ten weeks of postnatal HFHS diet.

In relation to mitochondrial parameters, it is established that fusion allows the mitochondrion to compensate for functional defects of one another, in which the organelles transfer RNAs and proteins, and the process of fusion is mediated through mitofusin-1 and 2 [57]. In the present study, we have found diminished mitofusin-1 immunoccontent levels related to maternal swimming exercise using an overload to challenge the dams. Zhang et al. have already demonstrated that oocytes from *knockout* mice for the mitofusin-1 gene have lower ATP levels and arrested development of ovarian follicles, which is consistent with accelerated reproductive aging [58]. Others found that oocyte specific deletion of mitofusin-1 in mice cause accelerated depletion of ovarian follicular reserve [59]. Our findings related to maternal swimming with overload, thus, indicate that the intrauterine approach can lead to early ovarian failure by causing a significant downregulation of mitofusin-1.

The molecular pathways potentially affected by exercise or different types of diets were mildly affected in the offspring's ovaries. Although we did find an alteration in the pFOXO3a/FOXO3a ratio when comparing the groups, there was interaction between overloaded exercise and diet, which increased the phosphorylation of FOXO3a. Studies have already demonstrated that FOXO3a is a target of protein kinase B (Akt), a known regulator of genes related to the control of apoptosis, and if phosphorylated, it results in cytoplasmic retention, and inactivation of FOXO3a [60]. A study conducted by Liu et al. of in vitro culture of 2-day-old Sprague-Dawley oocytes demonstrated that the stem cell factor (SCF) can regulate the activation of Akt and suppression of FOXO3a in oocytes, inhibiting apoptosis [61]. The same researcher suggests a prevention of apoptosis in neonatal rat oocytes through

phosphorylation and subsequent inactivation of FOXO3a, indicating FOXO3a as a participating molecule in the formation of primordial follicles of neonatal rodent ovaries [61]. Others have demonstrated that cellular granulosa hormones could reduce phosphorylation of FOXO3a and, as a downstream component of the PI3K/PTEN/AKT pathway, it would help to keep the primordial follicle untouched, in a dormant state [62,63]. Additionally, mice exposed to gonadotoxic substances and treated with melatonin did not present a great primordial follicle pool loss or granulosa cells apoptosis due to a decrease in the phosphorylation of FOXO3a [64]. Our findings of a rise in the pFOXO3a/FOXO3a open a great number of questions in this scenario. More studies on this particular subject are necessary before reaching any conclusion on the real effect of enhanced pFOXO3a/FOXO3a ratios in animals subjected to prenatal swimming exercise with overload and postnatal HFHS diet allied.

In the present study, we demonstrated that the animals subjected to the prenatal and postnatal interventions did not present any alteration in the immunocontents of AMPK, pAMPK, or pAMPK/AMPK ratio. Studies have already shown that diminished pAMPK/AMPK ratio related to exercise is associated with early ovarian aging, and that dysregulation of AMPK and pAMPK is related to insulin resistance and metabolic syndrome [65,66]. In this context, more studies are necessary to confirm the real ovarian effects of maternal swimming and postnatal HFHS diet on pAMPK/AMPK parameters.

Taken together, we found that overload maternal swimming and postnatal HFHS diet interventions tend to have mild harmful effects, mostly on ovarian redox network parameters. The maternal exercise with overload intervention might be pointing towards a possible mitochondria-related early ovarian aging and failure, although the study of mitochondrial fission is necessary. Concerning the

immunocontents of the total and phosphorylated forms of FOXO3a and AMPK, further studies on associated molecular pathways are needed to fully disclose the status of the ovarian follicle pool, whether it is being preserved or depleted, before reaching any real conclusions on related ovarian aging.

Finally, our findings in the present study tend to confirm that maternal swimming with 2% bodyweight overload combined with HFHS diet during postnatal adulthood leads to mild redox network maladaptation to the reproductive organs of female offspring. Such findings corroborate prior data regarding the harmful effects of overload maternal swimming already observed in offspring brain redox network by our research group [26]. Overall, more studies on ovarian mitochondrial dynamics, oxidant contents, and molecular pathways related to exercise with overload and dietary intervention are necessary to confirm the general effects found in this study of both pre and postnatal approaches on the ovarian environment.

Acknowledgments

This study received financial support from PROPESQ/UFRGS, FAPERGS (PQG 19/2551-0001747-2), and CNPq (PQ n°: 304293/2018-0 and INCT 465671/2014-4).

5. References

1. Kopp W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2019;Volume 12.
2. Mittendorfer B. Origins of metabolic complications in obesity: adipose tissue and free fatty acid trafficking. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2011;14:535–41.
3. Carrera-Bastos P, Fontes, O’Keefe, Lindeberg, Cordain. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Research Reports in Clinical Cardiology*. 2011;
4. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81.

5. Reik W. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*. 2001;293.
6. BARKER D. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet*. 1986;327.
7. Suzuki K. The developing world of DOHaD. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2018;9.
8. Barker DJ, Osmond C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 1986;40.
9. Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B, Simmonds SJ. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. *The Lancet*. 1989;334.
10. Barker DJP, Godfrey KM, Gluckman PD, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet*. 1993;341.
11. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*. 1993;307.
12. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. 2007;261.
13. Lawrence W, Thornburg, Kent. Developmental Origins, Epigenetics, and Equity: Moving Upstream. *Matern Child Health J*. 2016;20:935–40.
14. Skinner MK, Manikkan M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:214–22.
15. Jazwiec PA, Sloboda DM. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *Journal of Endocrinology*. 2019;242.
16. Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, et al. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *Journal of Endocrinology*. 2010;206.
17. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:9372–7.
18. Reynolds KA, Boudoures AL, Chi MM-Y, Wang Q, Moley KH. Adverse effects of obesity and/or high-fat diet on oocyte quality and metabolism are not reversible with resumption of regular diet in mice. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015;27.
19. Bianchi C, Battini L, Aragona M, Lencioni C, Ottanelli S, Romano M, et al. Prescribing exercise for prevention and treatment of gestational diabetes: review of suggested recommendations. *Gynecological Endocrinology*. 2017;33:254–60.

20. Prather H, Spitznagle T, Hunt D. Benefits of Exercise During Pregnancy. *PM&R*. 2012;4:845–50.
21. Klein CP, Rodrigues KS, Hözer RM, Couto-Pereira NS, Saccomori AB, Magro BMD, et al. Swimming exercise before and during pregnancy: Promising preventive approach to impact offspring's health. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2018;71.
22. Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal of Obesity*. 2015;39.
23. Stone V, Kudo KY, Marcelino TB, August PM, Matté C. Swimming exercise enhances the hippocampal antioxidant status of female Wistar rats. *Redox Report*. 2015;20.
24. Marcelino TB, Longoni A, Kudo KY, Stone V, RECH A, Assis AM de, et al. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*. 2013;246.
25. Marcelino TB, Rodrigues PI de L, Klein CP, Santos BG dos, Miguel PM, Netto CA, et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. *Behavioural Brain Research*. 2016;312.
26. August PM, Hözer R, Rodrigues KS, dos Santos BG, Maurmann RM, Scortegagna MC, et al. Effect of Maternal Exercise on Diet-induced Redox Imbalance in Hippocampus of Adult Offspring. *Neuroscience*. 2020;437:196–206.
27. Kaminski SL, Grazul-Bilska AT, Harris EK, Berg EP, Vonnahme KA. Impact of maternal physical activity during gestation on porcine fetal, neonatal, and adolescent ovarian development. *Domestic Animal Endocrinology*. 2014;48.
28. National Research Council (U.S.), Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), National Academies Press (U.S.), editors. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington, D.C: National Academies Press; 2011.
29. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the care and use of experimental animals*. Vol. 1. Ottawa, Ont.: Canadian Council on Animal Care; 1993.
30. Wasinski F, Bacurau RFP, Estrela GR, Klempin F, Arakaki AM, Batista RO, et al. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2015;12.
31. Chinkin A.S. The effects of various swimming training protocols on cardiac capacity and ventricular fibrillation threshold in rats. *Centr Eur J Sport Sci Med*. 2013;2:9–14.
32. Roberts JS, Perets RA, Sarfert KS, Bowman JJ, Ozark PA, Whitworth GB, et al. High-fat high-sugar diet induces polycystic ovary syndrome in a rodent model. *Biology of Reproduction*. Society for the Study of Reproduction; 2017;96:551–62.

33. Volk KM, Pogrebna VV, Roberts JA, Zachry JE, Blythe SN, Toporikova N. High-Fat, High-Sugar Diet Disrupts the Preovulatory Hormone Surge and Induces Cystic Ovaries in Cycling Female Rats. *Journal of the Endocrine Society*. 2017;1.
34. Organisation for Economic Co-operation and Development. PART 3: FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM - GUIDANCE DOCUMENT FOR HISTOLOGIC EVALUATION OF ENDOCRINE AND REPRODUCTIVE TESTS IN RODENTS [Internet]. Organisation for Economic Co-operation and Development; 2009. Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/43754782.pdf>
35. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170–5.
36. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1984 [cited 2021 Feb 27]. p. 121–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>
37. Wendel A. [44] Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1981 [cited 2021 Feb 27]. p. 325–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981770460>
38. Thornalley PJ, Tisdale MJ. Inhibition of proliferation of human promyelocytic leukaemia HL60 cells by S-d-lactoylglutathione in vitro. *Leukemia Research*. 1988;12:897–904.
39. Browne RW, Armstrong D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. *Free Radical and Antioxidant Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 1998 [cited 2021 Feb 27]. p. 347–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-472-0:347>
40. Reznick AZ, Packer L. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1994 [cited 2021 Feb 27]. p. 357–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687994330417>
41. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 1977;83:346–56.
42. Sun C, Velazquez MA, Fleming TP. DOHaD and the Periconceptional Period, a Critical Window in Time. *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2021 Mar 6]. p. 33–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128013830000037>
43. Stone V, Maurmann RM, Magro BM dal, Crestani MS, Hozer RM, Klein CP, et al. Gestational caloric restriction with micronutrients supplementation does not delay development and promotes feeding behavior benefits. *Nutritional Neuroscience*. 2019;
44. Stone V, Crestani MS, Saccomori AB, Magro BM dal, Maurmann RM, August PM, et al. Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;67.

45. Magro BMD, Stone V, Klein CP, Maurmann RM, Saccomori AB, Santos BG dos, et al. Developmental programming: intrauterine caloric restriction promotes upregulation of mitochondrial sirtuin with mild effects on oxidative parameters in the ovaries and testes of offspring. *Reproduction, Fertility and Development*. 2020;32.
46. Stone V, August PM, Stocher DP, Klein CP, Couto PRG, Silva YD, et al. Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. *Free Radical Research*. 2016;50.
47. de Melo GB, Soares JF, Costa TCL, Benevides ROA, Vale CC, Paes AM de A, et al. Early Exposure to High-Sucrose Diet Leads to Deteriorated Ovarian Health. *Front Endocrinol*. 2021;12:656831.
48. Falone S, Santini SJ, Cordone V, Grannonico M, Cacchio M, Di Emidio G, et al. Regular and Moderate Exercise Counteracts the Decline of Antioxidant Protection but Not Methylglyoxal-Dependent Glycative Burden in the Ovary of Reproductively Aging Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1–13.
49. Sadowska J, Dudzińska W, Skotnicka E, Sielatycka K, Daniel I. The impact of a diet containing sucrose and systematically repeated starvation on the oxidative status of the uterus and ovary of rats. *Nutrients*. MDPI AG; 2019;11.
50. Yan S, Wang F, Shi Q. The effect of maternal high-fat-diet mediated oxidative stress on ovarian function in mice offspring. *Exp Ther Med*. 2020;20:1–1.
51. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54:287–93.
52. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, et al. The balance between copper-zinc superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry*. 1991;30:9305–13.
53. Cristiano F, de Haan JB, Iannello RC, Kola I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1995;80:93–105.
54. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the Ratio of Cu/Zn-Superoxide Dismutase to Glutathione Peroxidase Activity Induces Features of Cellular Senescence and This Effect Is Mediated by Hydrogen Peroxide. *Hum Mol Genet*. 1996;5:283–92.
55. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108.
56. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:49.
57. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, et al. Mitochondrial Fission Factor Drp1 Maintains Oocyte Quality via Dynamic Rearrangement of Multiple Organelles. *Current Biology*. 2014;24:2451–8.

58. Zhang M, Bener MB, Jiang Z, Wang T, Esencan E, Scott III R, et al. Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve. *Cell Death Dis.* 2019;10:560.
59. Chiang JL, Shukla P, Pagidas K, Ahmed NS, Karri S, Gunn DD, et al. Mitochondria in Ovarian Aging and Reproductive Longevity. *Ageing Research Reviews.* 2020;63:101168.
60. Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. *Developmental Biology.* 2006;299:1–11.
61. Liu H, Luo L-L, Qian Y-S, Fu Y-C, Sui X-X, Geng Y-J, et al. FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009;381:722–7.
62. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews.* 2015;36:1–24.
63. Sonigo C, Beau I, Grynberg M, Binart N. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. *FASEB j.* 2019;33:1278–87.
64. Jang H, Lee O-H, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M, et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *J Pineal Res.* 2016;60:336–47.
65. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2013;123:2764–72.
66. Saha A, Coughlan K, Valentine R, Ruderman N. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *DMSO.* 2014;241.

PARTE III

6. DISCUSSÃO

O exercício físico durante o período gestacional é recomendado por diversos órgãos internacionais, demonstrando benefícios da prática de 150 minutos semanais de atividade aeróbica moderada, devendo ser estendida pelo período pós-parto (PIERCY *et al.*, 2018). A inatividade física por si só já é um fator de risco para mortalidade precoce (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010); e, considerando o período gestacional, a inatividade física já foi descrita como um fator de risco correlacionado ao aparecimento de doenças como diabetes mellitus tipo 2, pré-eclâmpsia e obesidade materna (ARTAL, 2015; DYE *et al.*, 1997). A prática de exercício físico não aparenta promover riscos obstétricos em gestações sem complicações (DE OLIVERIA MELO *et al.*, 2012; PRICE; AMINI; KAPPELER, 2012). Mulheres com complicações obstétricas e/ou comorbidades associadas devem ser orientadas à prática de exercício físico de forma individualizada (ACOG COMMITTEE OPINION, 2020). Anteriormente, já foram mencionadas as crescentes taxas de obesidade associadas principalmente ao aumento de doenças consideradas ocidentais, como câncer e problemas cardíacos (BLÜHER, 2019; CORDAIN *et al.*, 2005), relacionadas à mudança de hábitos nutricionais (EATON; KONNER, 1985; GARN; LEONARD, 2009; JAMES *et al.*, 2001; KOPP, 2019). As recomendações nutricionais durante o período gestacional mencionam que “[...] o que é consumido por uma mulher durante a gestação deve cobrir suas necessidades nutricionais, facilitar o crescimento fetal, preparar o corpo para um parto sem complicações e contribuir para um satisfatório período de aleitamento materno” (ORTEGA, 2001). Em recomendações descritas por Ortega (2001), o consumo de laticínios, carnes brancas e vermelhas, frutas, cereais e legumes deve ocorrer em porções que variam de 3 a 5 vezes por dia durante todo o período gestacional. Cabe ressaltar, entretanto, que as recomendações não costumam ser seguidas pela população, e que mesmo a existência dessas recomendações muitas vezes não é de conhecimento de mulheres em idade fértil. Como mencionado por Jackson e Robinson (2001), é necessário que as recomendações nutricionais durante a gestação enfatizem o consumo de dietas balanceadas e variadas, levando em consideração a necessidade de atividade física e descanso adequados durante o período.

Considerando os diferentes tipos de exercício físico existentes, ressalta-se a importância daqueles praticados em ambiente aquático. A natação é uma prática de

exercício físico que envolve a movimentação de todo o corpo, extremamente recomendada para pessoas acima do peso ou obesas, para quem a prática de outros exercícios, como caminhadas ou corrida, pode não ser tão agradável e causar mais impactos nas articulações (FÜZÉKI; BANZER, 2018). Estudos demonstraram que, em mulheres hipertensas (níveis baixos ou moderados) praticantes de natação intermitente (períodos curtos de natação estilo livre seguidos de recuperação de 2 minutos), houve aumento da sensibilidade à insulina e biomarcadores de função vascular (CONNOLLY *et al.*, 2016). Relacionado a esse achado, de la Cerda *et al.* (2011) demonstraram que, em mulheres que praticaram exercício físico por 8 semanas, houve redução de sintomas depressivos. Em mulheres jovens, entre 18 e 25 anos, sofrendo de síndrome pré-menstrual (sintomas psicológicos, comportamentais e físicos anteriores ao período menstrual e que desaparecem após tal período), demonstra-se que, após prática de natação, houve melhora de parâmetros relacionados à ansiedade, depressão, coordenação motora, fadiga, cólicas e inchaço (MAGED *et al.*, 2018). Outros estudos demonstraram que a prática de exercícios físicos agudos ou de repetição pode levar à diminuição de níveis de esteroides sexuais, como LH (ELIAS; WILSON, 1993), o que é corroborado por ainda outros estudos, que demonstraram que mulheres engajadas em prática de exercício físico apresentam um estado de diminuição de estrógenos, resultante da supressão de GnRH hipotalâmico (WARREN; PERLROTH, 2001). Por outro lado, a prática de exercício físico é relacionada a um menor risco de câncer de mama, devido à diminuída exposição a hormônios endógenos e à consequente, direta ou indiretamente, prevenção de ganho de peso e adiposidade visceral em mulheres pós-menopausa (MONNINKHOF; PEETERS; SCHUIT, 2007). Considerando a prática de exercício físico, cabe ressaltar o uso de natação como uma alternativa viável para muitos indivíduos, em especial gestantes. Em estudo randomizado, foi possível observar que mulheres participantes de programa de treinamento aquático durante a gestação tinham taxas maiores de inalteração do períneo após o parto (ALBERTON *et al.*, 2019). Além disso, já foi demonstrada diminuição de dor nas costas durante a gestação relacionada à prática de exercícios aquáticos (KIHLESTRAND *et al.*, 1999). Em estudo com gestantes brasileiras participantes que verificou os benefícios do exercício em ambiente aquático, 65% das participantes mencionaram que a prática tornaria o processo de parto mais fácil (VALLIM *et al.*, 2011). Além disso, muitas participantes relataram o impacto no bem-estar físico e emocional causado pela

prática, além de acreditarem que haveria melhora na saúde geral do bebê em desenvolvimento (VALLIM *et al.*, 2011).

Poucos são os estudos que avaliam o efeito da natação sobre parâmetros reprodutivos femininos. Em um estudo de revisão sobre a prática de exercício físico e ovulação (HAKIMI; CAMERON, 2017), houve apenas uma menção à natação. Nesse estudo, conduzido por Rich-Edwards *et al.* (2002), foram avaliados diversos tipos de exercício físico vigoroso, entre eles a prática de natação, demonstrando um caráter protetor da prática sobre a função ovariana em mulheres com índice de massa corporal normal. Em relação ao período reprodutivo, um estudo com mulheres grávidas, na Dinamarca, demonstrou que cerca de 5% da população do estudo praticava natação como exercício físico antes da gestação, aumentando para 6% durante o período inicial gestacional, dentro dos parâmetros recomendados pelo órgão nacional competente (3,5 horas ou mais de exercício físico semanal) (BROBERG *et al.*, 2015). Atualmente, muitos modelos animais são utilizados para avaliar o efeito da prática de natação antes e durante a gestação. Estudos do nosso e de outros grupos de pesquisa demonstraram que a prática não altera o desenvolvimento neuromotor ou características físicas da prole nos primeiros dias após o nascimento (KLEIN *et al.*, 2018; MARCELINO, 2016; ROBINSON; BUCCI, 2014), promovendo também melhora de parâmetros relativos a defesas antioxidantes e funcionalidade mitocondrial em outros órgãos das ratas-mães e seus filhotes (MARCELINO, 2013; STONE *et al.*, 2015). O artigo mais recente produzido pelo nosso grupo, utilizando natação com 2% do peso corporal de sobrecarga, demonstrou que, no músculo sóleo de filhotes fêmeas de mães submetidas à natação durante a gestação, há diminuição de defesas antioxidantes, de parâmetros de dano oxidativo a proteínas e níveis de oxidantes, além de aumento da função mitocondrial (HÖZER *et al.*, 2021). No estudo de August *et al.* (2020), os animais foram submetidos à natação com 2% de sobrecarga seguida de dieta com alto conteúdo de gordura durante o período de desenvolvimento pós-natal, o que demonstrou melhora no estado redox hipocampal, evidenciado pela atividade de SOD, porém parcialmente prevenindo o aumento de superóxido mitocondrial (AUGUST *et al.*, 2020). A partir da prática de natação como exercício físico, se teoriza qual o efeito que esta, quando praticada durante o período gestacional, teria sobre o desenvolvimento da prole, principalmente se seria capaz de modular uma resposta positiva aos desafios nutricionais encontrados pela prole na vida adulta.

As dietas que utilizam alto conteúdo de gordura são frequentemente utilizadas como uma forma de estudo da obesidade, hiperglicemia e resistência insulínica, atualmente sendo utilizadas para estudo das características relacionadas à síndrome metabólica (SMALL *et al.*, 2018). Correlacionado a isso, estudos já demonstraram que diferentes percentuais de gordura tendem a levar a diferentes resultados. Em estudo que comparou dietas com diferentes percentuais de gordura (10% vs 45% vs 60%), houve alteração de vários metabólitos nos pulmões dos camundongos submetidos; entretanto, menos da metade desses metabólitos eram comuns entre as dietas com 45% e 60% de gordura, demonstrando diferentes impactos do percentual de gordura sobre os parâmetros estudados (SHOWALTER *et al.*, 2018). Utilizando ratos, observou-se que os animais submetidos a dietas com alto conteúdo de gordura monossaturadas tendem a ter maior grau de resistência à insulina que animais consumindo dietas com outros tipos de gordura (BUETTNER *et al.*, 2006; STORLIEN *et al.*, 1991). Um estudo dos anos 1970 demonstrou aumento do peso corporal e hiperglicemia em dietas com alta gordura e baixo conteúdo de carboidrato (SUSINI; LAVAU, 1978), seguido por outro estudo do mesmo grupo demonstrando que o consumo de dietas com alto conteúdo de gordura e açúcar é suficiente para produzir os efeitos da síndrome metabólica em camundongos da linhagem C57BL/6J (SURWIT *et al.*, 1988).

Ainda que disponíveis muitos estudos sobre síndrome metabólica e características associadas, poucas são as pesquisas envolvendo o consumo de dietas com alto conteúdo de gordura (com ou sem adição de alto conteúdo de açúcar) e sistema reprodutor feminino. Em busca na literatura, apenas uma revisão por Hohos e Skaznik-Wikiel (2017) compilou dados sobre o tema. Relacionado ao ciclo estral, já foi demonstrado um efeito negativo das dietas com alto conteúdo de gordura, com aumento da incidência de anovulação dos animais submetidos ao protocolo (FERNANDEZ *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2010), além de diminuição de taxas de fertilidade (BRANNIAN *et al.*, 2001; BROTHERS *et al.*, 2010; TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004; WU *et al.*, 2014). Entretanto, outros estudos demonstraram que camundongos expostos a dietas com alto conteúdo de gordura não têm alteração de ciclo estral ou taxas de fertilidade, mas apresentam diminuição de folículos ovulados e menor número de filhotes por ninhada (MA *et al.*, 2016). Em relação à morfologia ovariana, a exposição a dietas com alto conteúdo de gordura leva, no geral, à diminuição na contagem de folículos primordiais (SKAZNIK-

WIKIEL *et al.*, 2016; SOHRABI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014), além de aumentar atresia folicular (JUNGHEIM *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014). Estudos sobre o efeito de dietas com alto conteúdo de gordura demonstraram resultados conflitantes em outros subtipos de folículos ovarianos: ora há aumento desses tipos foliculares (SOHRABI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014), ora não há alteração (FERNANDEZ *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2014; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016), ora ocorre declínio (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012; BROTHERS *et al.*, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 2016; TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004; WU *et al.*, 2014). Tais resultados podem ser explicados pelos diferentes percentuais de gordura entre as dietas selecionadas, variando de 45% a 60% (HOHOS; SKAZNIK-WIKIEL, 2017).

Outros estudos avaliaram o que seria responsável pelo declínio reprodutivo relacionado a dietas com alto conteúdo de gordura: se a dieta em si ou se a obesidade relacionada. Utilizando uma dieta de 40% de gordura por 4 semanas, foi possível observar baixo ganho de peso em camundongos CBA em relação ao grupo controle (WU *et al.*, 2010). Entretanto, os animais do grupo dieta demonstraram prejuízo na qualidade oocitária, aumento de acúmulo de gotas lipídicas nas células da granulosa e oócitos, além de alterações na ovulação e fertilização (WU *et al.*, 2010). Em outro estudo, camundongos C57BL/6J consumiram dieta com 60% de gordura por 32 semanas, o que foi seguido de testes de acasalamento por 5 meses. Apenas alguns animais do grupo dieta se tornaram obesos, enquanto outros permaneceram com o mesmo peso dos animais controle (SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016). Nesse estudo, foram avaliados parâmetros relacionados à fertilidade e função ovariana, observando que os animais submetidos a uma dieta de 60% de gordura demonstravam depleção de reserva ovariana e aumento de marcadores de inflamação, independentemente do ganho de peso. Tal dado sugere que a causa da disfunção reprodutiva é derivada do consumo de gordura em si, não da presença ou não do fenótipo de obesidade (SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016). Com camundongos BALB/c expostos a dieta de 60,9% de gordura por 12 semanas, não houve ganho de peso significativo em comparação com os controles (SOHRABI *et al.*, 2015). Da mesma forma, no estudo de Skaznik-Wikiel *et al.* (2016), apesar de não haver o fenótipo obeso, os animais do grupo dieta demonstraram parâmetros sugestivos de foliculogênese alterada, além de diminuição de oócitos maduros (SOHRABI *et al.*, 2015). Contudo, o consumo de dietas com alto conteúdo de gordura aparenta ser o causador da disfunção reprodutiva, os dados são controversos. Em comparação de linhagens murinas com consumo de

dieta com 45% de gordura, apenas a linhagem DBA/2J desenvolveu obesidade e alteração de fertilidade, enquanto camundongos C57BL/6J não se tornaram obesos nem tiveram alteração em taxas de gravidez em comparação com animais controle (TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004). Cabe ressaltar que tal resultado pode ser devido ao menor percentual de gordura, uma vez que pesquisas envolvendo camundongos C57BL/6J e dietas com 60% de gordura já demonstraram alteração da fertilidade (JUNGHEIM *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2016; REYNOLDS *et al.*, 2015; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016).

O nosso estudo utilizando exercício físico durante a gestação seguido de administração de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar teve como objetivo verificar o efeito das intervenções pré e pós-natais sobre parâmetros redox e vias de sinalização relacionadas no ovário da prole adulta de ratos Wistar.

Foi possível observar que, apesar de a natação com sobrecarga não ter prevenido completamente o ganho de peso dos animais submetidos a uma dieta obesogênica no período pós-natal, a intervenção durante o período gestacional conseguiu atrasar o ganho de peso em duas semanas quando em comparação com animais provenientes de mães sedentárias consumindo a mesma dieta. Em relação à arquitetura celular, a combinação da intervenção de natação gestacional aliada à dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar pós-natal não levou a alterações significativas nos folículos ovarianos, porém houve presença de características morfológicas anormais, como infiltrado de hemácias e gotas lipídicas em todos os grupos estudados. Corroborando, Akamine *et al.* (2010) submeteram ratos Wistar de 8-10 semanas de idade a dieta com alto conteúdo de gordura por 4 ou 6 meses, também relatando vacuolização anormal e gotas lipídicas, ainda que não sendo estatisticamente significante. Correlacionado a alterações de morfologia celular, outros estudos já demonstraram aumento do número de folículos atrésicos em animais submetidos a dieta contendo 25% de sacarose (DE MELO *et al.*, 2021). No mesmo estudo, os animais submetidos a dieta com alto conteúdo de açúcar apresentam sinais de puberdade precoce cerca de 2,5 dias antes do que animais controle (DE MELO *et al.*, 2021). No nosso estudo, não foi possível verificar o ciclo estral ou iniciação sexual dos animais durante o protocolo de 10 semanas de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar. Entretanto, acreditamos que os animais aqui submetidos a essa dieta também apresentariam alterações de ciclo estral, algo já visualizado por outros pesquisadores em condições similares. Um estudo por Volk *et*

al. (2017) utilizou ratos Sprague-Dawley em dieta de 60% de gordura e 32% de açúcar por 14 semanas. Os pesquisadores demonstraram que há alteração do ciclo estral: os animais que consumiram a dieta obesogênica passavam mais tempo do ciclo no estado de estro, além de metade dos animais do grupo dieta exibirem ciclos estrais estendidos (VOLK *et al.*, 2017).

Como citado anteriormente, a produção de oxidantes intracelular e defesas antioxidantes associadas são essenciais para a produção de hormônios ovarianos esteroides, além de para a ovulação e implantação embrionária (RIZZO *et al.*, 2012). Contudo, alterações no estado redox são relacionadas a algumas alterações do sistema reprodutor feminino, como é o caso de alteração da qualidade oocitária, anovulação, infertilidade sem causa aparente e endometriose (AGARWAL *et al.*, 2012). Tais dados são corroborados por outros pesquisadores, que hipotetizam a relação entre alterações no sistema antioxidante ovariano e uterino e distúrbios relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (SADOWSKA *et al.*, 2019), além de dados sobre o consumo de dieta com alto conteúdo de gordura por 4 e/ou 6 meses demonstrarem alterações de capacidade reprodutiva (AKAMINE *et al.*, 2010). Cabe ressaltar, entretanto, a escassa literatura disponível sobre o tema.

Com relação aos dados coletados no presente artigo, foi visualizado que, dentre os parâmetros de atividade antioxidante estudados, houve diminuição da atividade enzimática da SOD pelo exercício físico materno de natação com sobrecarga em associação ou não com a dieta obesogênica pós-natal, enquanto a dieta diminuiu a atividade enzimática da GPx de forma isolada. Estudos anteriores já demonstraram que o consumo de dietas obesogênicas podem levar à alteração de fatores relacionados à homeostasia redox. Yan, Wang e Shi (2020) demonstraram que o consumo de dietas obesogênicas leva ao aumento da atividade da SOD nos ovários da prole. Utilizando uma dieta com 16% de açúcar, já foi possível observar diminuição da atividade de SOD, porém sem impacto na atividade enzimática da GPx (SADOWSKA *et al.*, 2019). As presentes intervenções estudadas não foram capazes de alterar as atividades das enzimas CAT e GLO I. Pesquisadores já evidenciaram que atividades adequadas de SOD e CAT ou GPx podem afetar a sensibilidade celular ao estresse oxidativo, ao passo que perturbações podem resultar em condições pró-oxidantes (AMSTAD *et al.*, 1991; CRISTIANO *et al.*, 1995; DE HAAN *et al.*, 1996). Com relação a isso, nosso estudo demonstrou que há uma diminuição da razão SOD/(GPx+CAT) no grupo de animais que consumiu dieta obesogênica e que eram

provenientes de mães exercitadas. Como resultado, cria-se a hipótese de que há uma maior produção de oxidantes não sendo removida por enzimas detoxificadoras, uma vez que a razão dessas atividades enzimáticas está alterada. Considerando que as atividades de enzimas antioxidantes, como SOD, GPx e outras, são essenciais para processos fisiológicos como esteroidogênese, ovulação e implantação (AGARWAL *et al.*, 2012; SHKOLNIK *et al.*, 2011), nossos dados apontam para um estado inicial de dano ovariano pela diminuição da capacidade do sistema de defesa antioxidante nos grupos com diminuição da atividade enzimática, apesar de não ter sido encontrado dano oxidativo a proteínas ou em antioxidantes não-enzimáticos, como a GSH.

Em relação ao sistema reprodutor feminino, cabe ressaltar a função das vias moleculares destacadas, e que diversos artigos já corroboraram a presença e funções essenciais relacionadas a mitofusina-1, AMPK e FOXO3a. Da mesma forma, muitas são as vias de sinalização moleculares que podem ser influenciadas pela prática de exercício físico e/ou alterações nutricionais. Considerando o papel ativo da mitocôndria na formação de oxidantes e manutenção de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, o estudo dessa organela e suas vias de sinalização associadas torna-se de extrema importância. Em relação ao exercício, já foi demonstrado que a prática acarreta diversas mudanças na dinâmica e função mitocondrial, sendo dependente da intensidade do exercício (SORRIENTO; DI VAIA; IACCARINO, 2021). Em relação à fusão mitocondrial e exercício, ressalta-se a família de mitofusinas – proteínas transmembrana mitocondrial – que tem como papel principal a responsabilidade de fusão e *docking* de mitocôndrias (COHEN; TARESTE, 2018), existindo nas isoformas de mitofusina-1 e mitofusina-2 (JOAQUIM; ESCOBAR-HENRIQUES, 2020). As mitofusinas-1 e 2 têm uma alta similaridade, entretanto possuem papéis diferentes. Enquanto a deleção de mitofusina-1 leva à fragmentação mitocondrial em pedaços pequenos espalhados pelo citoplasma, a deleção de mitofusina-2 causa fragmentação de pedaços maiores de mitocôndria, justapostos ao núcleo (CHEN *et al.*, 2003). Sobre a mitofusina-1, um artigo por Cartoni *et al.* (2005) demonstrou que a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de mitofusina-1/2 não é alterada 2 horas após uma sessão única de exercício, porém se encontra aumentada 24 horas após o exercício. Outro artigo evidenciou que, 4 horas após a prática de exercício em humanos, não há alteração nos níveis de mitofusina-1, mas que há aumento nos níveis após 2 semanas de treinamento subsequente (PERRY *et al.*, 2010). Em tecido muscular esquelético adulto, Bell *et al.* (2019)

publicaram que a deleção concomitante de mitofusina-1 e mitofusina-2 é capaz de promover diminuição da capacidade de exercício após 8 semanas de protocolo, enquanto deleções individuais não parecem surtir efeito.

Com relação aos dados coletados neste trabalho, houve diminuição do imunoconteúdo de mitofusina-1 relacionada à prática de natação durante o período gestacional. Artigos já demonstraram o papel necessário da mitofusina-1 em relação à fertilidade feminina. Em estudo publicado por Zhang *et al.* (2019), percebeu-se que a deleção oócito-específica para o gene *Mfn1* (*Mfn^{-/-}*) causa infertilidade por prejuízo do desenvolvimento folicular e ausência de maturação oocitária, além de função e dinâmica mitocondriais prejudicadas e aceleração da depleção folicular, consistente com fenótipos relacionados à diminuição da reserva ovariana (ZHANG *et al.*, 2019). O dano na conexão oócito-granulosa, indicada pela diminuição das junções gap em oócitos *Mfn^{-/-}* publicada por Zhang *et al.* (2019), é corroborado por outros, que mencionam a importância da correta comunicação celular com as células circundantes da granulosa para garantir a troca de metabólitos necessários ao desenvolvimento oocitário correto (LOWTHER *et al.*, 2017). Em outro artigo, a deleção homozigótica de *Mfn1* individual ou em associação com *Mf2* levou à esterilidade dos animais do estudo, resultado provavelmente relacionado a uma deficiência de mitofusina-1 nos oócitos, apesar de haver uma manutenção do padrão de acasalamento normal (CARVALHO *et al.*, 2020). Em análise ultraestrutural de oócitos com deleção homozigótica de *Mfn1*, foi possível observar diminuição do número de cristas mitocondriais e aumento de vesículas dentro da membrana interna mitocondrial (CARVALHO *et al.*, 2020). Corroborando o artigo publicado por Zhang *et al.* (2019), a publicação de Carvalho *et al.* (2020) também demonstrou diminuição no número de cópias de DNA mitocondrial. De forma geral, nossos resultados, aliados a outros na literatura, nos fazem acreditar que o exercício físico de natação com sobrecarga pode ser capaz de exercer efeitos similares a pesquisas anteriores, colocando nossos animais num estado inicial de depleção de reserva e envelhecimento ovariano precoce.

Considerando parâmetros como metabolismo celular, crescimento e diferenciação celulares, senescência, estresse oxidativo e autofagia, ressalta-se a importância da família de *forkhead box O* (FOXO), que consiste nas proteínas FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6 em humanos (LEE; DONG, 2017). Dentre os tipos de FOXO existentes, convém destacar a função da FOXO3 e seu papel com apoptose

celular. A FOXO3 tem localização primordialmente nuclear, podendo ser translocada ou não por modificações pós-translacionais, das quais cabem ressaltar duas: (a) fosforilação da FOXO pelo AMPK em locais específicos (Thr 179, Ser 399, Ser 413, Ser 555, Ser 588 e Ser 626) sem afetar localização nuclear, promovendo expressão gênica relacionada à resistência a estresse celular (CHACCIERA; SIMONE, 2010; GREER *et al.*, 2007); e (b) fosforilação da FOXO3a nuclear em três posições de aminoácidos (Thr 32, Ser 253 e Ser 315), mediada pela AKT, levando à exportação ao citoplasma e subsequente degradação (BRUNET *et al.*, 1999). As modificações pós-translacionais direcionam a FOXO3a a compartimentos celulares, induzindo genes específicos relacionados a diferentes processos celulares (FASANO *et al.*, 2019), uma vez que a FOXO3a é inativa quando citosólica, sendo translocada ao núcleo ou mitocôndria para promover sua atividade transcricional (CALNAN; BRUNET, 2008; WANG; YU; HUANG, 2016). Um artigo publicado por Lehtinen *et al.* (2006) evidenciou que a FOXO3a pode ser ativada por MST1 regulada por estresse oxidativo, levando à alteração na interação com proteínas e subsequente translocação nuclear e estimulação de genes pró-apoptóticos em células neuronais. Outros estudos demonstraram que a FOXO3 participa da gliconeogênese hepática, ao passo que depleção desta não causa alteração significativa nos níveis de glicose pré-prandial em um modelo com camundongos *knockout* para FOXO1 (HAEUSLER; KAESTNER; ACCILI, 2010). Em situações de jejum ou em estados diabéticos, a estimulação de FOXO1 ou FOXO3 no músculo esquelético pode levar à proteólise por dois mecanismos distintos, constituindo duas vias prováveis de encolhimento muscular (O'NEILL *et al.*, 2019). Em uma publicação com camundongos C57BL/6J machos consumindo dieta com alto conteúdo de gordura (35,3%) e açúcar por 46 semanas, foi possível observar diminuição dos níveis de mRNA de FOXO3a em diferentes regiões encefálicas dos animais, além de os animais do grupo dieta apresentarem ganho de peso significativo em relação ao grupo controle (ZEMVA *et al.*, 2011). Em estudos com proteínas homólogas a FOXO3a em outros organismos, já foi demonstrada a regulação negativa relacionada à via da sinalização da insulina, teorizando-se que a função da FOXO3a possa estar fortemente relacionada ao desenvolvimento e metabolismo dos organismos (ZHANG *et al.*, 2020). Em mamíferos, a FOXO3a pode ser fosforilada no núcleo, sendo transportada por chaperonas ao citoplasma após a ativação da sinalização da insulina (ZHANG *et al.*, 2020). A translocação ao citoplasma é caracterizada por inativar a função da FOXO3a

e promover a sua degradação por fatores que podem ser associados à poliubiquitinação e subsequente degradação por proteossomas (PLAS; THOMPSON, 2003; WANG *et al.*, 2015).

Nossos dados demonstram haver alteração na razão pFOXO3a/FOXO3a nos ovários dos animais, implicando interação entre exercício pré-natal e dieta obesogênica pós-natal, por aumento da fosforilação de FOXO3a em detrimento da sua forma total. Estudos recentes demonstraram o papel da FOXO3a no desenvolvimento folicular ovariano. Protocolos experimentais demonstraram que camundongos *knockout* para FOXO3a exibem ativação folicular global antecipada, causando depleção precoce de folículos ovarianos e morte oocitária (CASTRILLON, 2003). Oposto a isso, a superexpressão de FOXO3 em camundongos foi capaz de atrasar o desenvolvimento de folículos primordiais, aumentando a reserva folicular e a capacidade reprodutiva dos animais (PELOSI *et al.*, 2013). Pesquisadores como Liu *et al.* (2009) e Matsuda *et al.* (2011) publicaram que a proteína FOXO3 regula o crescimento e atresia foliculares, promovendo apoptose de células da granulosa e oócitos em ovários de mamíferos. Outros estudos já demonstraram que a fosforilação de FOXO3a leva à retenção na porção citoplasmática e inativação (LIU *et al.*, 2006). Já foi observado que fatores podem regular a atividade de moléculas relacionadas à via de sinalização da FOXO3a, levando à supressão da proteína nos oócitos e causando inibição da apoptose (LIU *et al.*, 2009). Por estudar a atividade de FOXO3a em culturas de oócitos provenientes de ratos Sprague-Dawley de 2 dias de idade, Liu *et al.* (2009) também sugeriram que FOXO3a seria uma molécula participante na formação de folículos primordiais nos ovários de roedores neonatos. Além disso, pesquisadores demonstraram que os hormônios das células da granulosa podem reduzir a fosforilação da FOXO3a, permitindo manter a reserva de folículos primordiais em um estado dormente e impedindo a ativação precoce e depleção (HSUEH *et al.*, 2015; SONIGO *et al.*, 2019). De forma similar, camundongos expostos a substâncias gonadotóxicas seguido por tratamento com melatonina não apresentaram alteração da apoptose celular de folículos primordiais devido à diminuição da fosforilação de FOXO3a (JANG *et al.*, 2016). Nosso resultado de aumento da forma fosforilada de FOXO3a aparenta indicar a ocorrência de uma ativação precoce e possível apoptose de células ovarianas dos animais. Entretanto, se comprovada a relação de FOXO3a com o desenvolvimento folicular ovariano, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi elucidado, e parece estar relacionado ao papel FOXO3a no reparo do DNA,

apoptose, estresse oxidativo e metabolismo (ZHANG *et al.*, 2020). De maneira geral, mais estudos com outras vias de sinalização relacionadas são de extrema importância antes de haver alguma conclusão real sobre o assunto.

Por fim, o exercício já foi descrito como capaz de promover um *turnover* mitocondrial, levando ao aumento da qualidade e função mitocondriais (CARTEE *et al.*, 2016; JOSEPH; ADHIHETTY; LEEUWENBURGH, 2016; SAFDAR *et al.*, 2011), onde a prática de exercício físico já demonstrou promover a autofagia de mitocôndrias anormais, também conhecida como mitofagia (LAKER *et al.*, 2017; VAINSHTEIN *et al.*, 2015; YOSHIOKA *et al.*, 2019). Relacionado a isso, o AMPK, composto de duas subunidades regulatórias e uma subunidade catalítica, já foi caracterizado como sensor metabólico chave. Em condições em que há grande elevação de AMP em relação à ATP, o AMPK tem sua atividade regulada alostericamente pelo AMP (GARCIA; SHAW, 2017). Da mesma forma que o exercício já foi relacionado à mitofagia, hipotetiza-se que o AMPK, por ser capaz de ativar o fluxo autofágico celular, possa ser influenciado pelo exercício a ativar vias relacionados ao *turnover* mitocondrial. Além disso, estudos teorizam que a conexão entre a percepção do status energético celular e dinâmica mitocondrial seja por meio do AMPK (SORRIENTO; DI VAIA; IACCARINO, 2021). Outros estudos corroboram tais dados, indicando o AMPK como regulador chave na fissão mitocondrial, levando à provável capacidade de iniciar a mitofagia de regiões mitocondriais danificadas (TREWIN; BERRY; WOJTOVICH, 2018). Artigos demonstraram que, além de função mitocondrial, o AMPK pode ser um sensor do estado redox (GARCIA; SHAW, 2017). Em artigo publicado por Choi *et al.* (2001), a exposição a peróxido de hidrogênio endógeno levou a um aumento nos níveis de AMPK por meio de alteração na razão AMP/ATP, o que foi corroborado por trabalhos posteriores (AUCIELLO *et al.*, 2014). A prática de exercício físico causa aumento da demanda bioenergética, levando ao aumento na razão AMP/ATP, que é percebida pelo AMPK, e levando a uma atividade pró-fissão mitocondrial (HOFFMAN *et al.*, 2015; LANTIER *et al.*, 2014; STEINBERG; KEMP, 2009), o que também foi corroborado por outros pesquisadores (HOFFMAN *et al.*, 2015; JAMART *et al.*, 2013; KITAOKA *et al.*, 2015; TOYAMA *et al.*, 2016).

Nossas intervenções de natação com sobrecarga pré-natal e dieta obesogênica por 10 semanas pós-natal não foram capazes de levar a alteração nos parâmetros relacionados ao imunociteúdo total ou fosforilado de AMPK. Segundo outros estudos, uma diminuição na razão pAMPK/AMPK pelo exercício físico é compatível

com estados de envelhecimento ovariano precoce; além disso, a desregulação de AMPK e pAMPK já demonstrou ter relação com resistência à insulina e síndrome metabólica (RUDERMAN *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2014). Em relação à função do AMPK, cabe ressaltar que seu papel na maturação oocitária é extremamente espécie-específico (BERTOLDO *et al.*, 2015a). Enquanto o AMPK é capaz de continuar a meiose em oócitos de camundongos (CHEN *et al.*, 2006; CHEN; DOWNS, 2008; DOWNS; CHEN, 2006; LAROSA; DOWNS, 2007), o mesmo não pode ser dito para ratos (DOWNS, 2011), além do fato de que a ativação farmacológica do AMPK bloqueia a maturação nuclear oocitária em porcos e bovinos (MAYES *et al.*, 2007; SANTIQUET *et al.*, 2014; TOSCA *et al.*, 2007). Em células da granulosa de humanos, o AMPK pode estar envolvido na produção de lactato, importante para desenvolvimento folicular correto (RICHARDSON *et al.*, 2009), considerando que o oócito é energeticamente dependente do metabolismo do lactato e piruvato provenientes do ciclo do TCA e fosforilação oxidativa (BIGGERS; WHITTINGHAM; DONAHUE, 1967; LEESE; BARTON, 1984; ROBERTS; FRANKS; HARDY, 2002), o que ocorre nas células da granulosa (RICHANI *et al.*, 2021; RUSSELL *et al.*, 2016). Além do ciclo do TCA, as células da granulosa também são capazes de metabolizar energia por meio da via das pentoses fosfato (RICHANI *et al.*, 2021), levando à produção de AMP cíclico, um importante regulador negativo da maturação meiótica (BERTOLDO *et al.*, 2015a), uma vez que a degradação deste por fosfodiesterases leva à continuação da meiose. A depleção de AMP cíclico leva ao aumento da razão AMP/ATP, ativando AMPK e, de forma subsequente, levando à ativação de diversas enzimas do oócito envolvidas na produção de energia e inibição de vias relacionadas ao consumo de energia (DOWNS; HUDSON; HARDIE, 2002). Em camundongos com deleção de α 1AMPK específica no oócito, houve diminuição de proteínas associadas à comunicação intercelular com células da granulosa em oócitos maduros, o que está relacionado à redução da fertilidade em ciclos de fertilização *in vitro* (BERTOLDO *et al.*, 2015b). A literatura sustenta o conceito do papel crucial do AMPK em manter a junção metabólica e intercelular entre o oócito e células somáticas, demonstrando por diversas vezes que a quebra dessas ligações leva à diminuição da competência oocitária (BERTOLDO *et al.*, 2015a).

Atualmente, não há outros estudos demonstrando o efeito do exercício de natação com sobrecarga seguido de dieta obesogênica pós-natal em parâmetros relacionados ao estado redox ovariano. Nossos resultados demonstram que as

intervenções pré e pós-natal mencionadas afetam a homeostase redox e vias antioxidantes de maneiras isoladas. Considerando nossos dados e as poucas pesquisas disponíveis na literatura atual, fica claro que mais estudos sobre o tema são necessários, tanto estudos relacionando apenas o impacto de intervenções com exercício físico durante o desenvolvimento intrauterino, quanto o resultado do consumo de dietas obesogênicas sobre o estado ovariano de animais adultos.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar que a associação de natação materna com sobrecarga e intervenção obesogênica durante o desenvolvimento pós-natal são capazes de levar a efeitos prejudiciais, com a maioria destes concentrados em parâmetros de homeostase redox ovariana. Os resultados provenientes da intervenção pré-natal podem estar indicando uma possível falha e envelhecimento ovarianos por meio de mecanismos relacionados à fusão mitocondrial. Entretanto, cabe o estudo de outros parâmetros relacionados à fissão mitocondrial para indicar qual o real estado de biogênese dessa organela nos ovários de ratos Wistar submetidos à natação durante a gestação seguida de consumo de dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar durante os estágios pós-natal da puberdade à fase adulta. Relacionado a outras vias de sinalização, é preciso o estudo de moléculas responsáveis pela cascada de eventos e ativação relacionados a FOXO3a e AMPK antes de se chegar a conclusões concretas sobre o seu impacto no conteúdo e envelhecimento ovarianos.

De forma geral, nossos dados aqui apresentados confirmam achados anteriores do grupo. Hözer *et al.* (2021) demonstraram alteração antioxidante nos tecidos musculares de machos e fêmeas submetidos a natação gestacional com sobrecarga de 2%. Utilizando natação com sobrecarga de 2% e dieta contendo apenas alto conteúdo de gordura durante o desenvolvimento pós-natal, August *et al.* (2020) verificaram que a prole submetida a tais intervenções tem alteração redox em diferentes regiões encefálicas. O presente trabalho esclarece que a prática de natação com sobrecarga de 2% de peso corporal combinada com dieta com alto conteúdo de gordura e açúcar no período pós-natal é capaz de levar a alterações prejudiciais na rede antioxidante de ovários da prole, bem como a alterações significativas em vias de sinalização responsivas a exercício e dieta.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>>.

AKAMINE, E. H. *et al.* Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 206, n. 1, p. 65-74, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1677/JOE-09-0461>>.

ALBERTON, C. L. *et al.* Water-based exercises in pregnancy: Apparent weight in immersion and ground reaction force at third trimester. **Clinical Biomechanics**, v. 67, p. 148-152, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2019.05.021>>.

ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>>.

AMSTAD, P. *et al.* The balance between copper-zinc superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. **Biochemistry**, v. 30, n. 38, p. 9305-9313, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00102a024>>.

ANDERSON, C. *et al.* Dietary glycemic index and glycemic load are positively associated with oxidative stress among premenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 1, p. 125-130, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/nxx022>>.

AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8742-8758, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules20058742>>.

AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21021-21044, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms141021021>>.

ARTAL, R. The role of exercise in reducing the risks of gestational diabetes mellitus in obese women. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 29, n. 1, p. 123-132, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.05.013>>.

ASEMI, Z. *et al.* Effects of DASH diet on lipid profiles and biomarkers of oxidative stress in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1287-1293, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.008>>.

AUCIELLO, F. R. *et al.* Oxidative stress activates AMPK in cultured cells primarily by increasing cellular AMP and/or ADP. **FEBS Letters**, v. 588, n. 18, p. 3361-3366, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.025>>.

AUGUST, P. M. *et al.* Effect of maternal exercise on diet-induced redox imbalance in hippocampus of adult offspring. **Neuroscience**, v. 437, p. 196-206, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.04.046>>.

AXELSON, J. F. Forced swimming alters vaginal estrous cycles, body composition, and steroid levels without disrupting lordosis behavior or fertility in rats. **Physiology & Behavior**, v. 41, n. 5, p. 471-479, 1987. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90083-7)>.

BAIRD, D. T. *et al.* Nutrition and reproduction in women. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 193-207, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humupd/dmk003>>.

BALASUBRAMANIAN, P. *et al.* High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats: diet-induced obesity and anovulation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 748-755, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02276.x>>.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600034>>.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>>.

BARKER, D. J. P. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90710-1)>.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-1081, 1986a. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1)>.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 40, n. 1, 1986b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/jech.40.1.37>>.

BELL, M. B. *et al.* Adult skeletal muscle deletion of Mitofusin 1 and 2 impedes exercise performance and training capacity. **Journal of Applied Physiology**, v. 126, n. 2, p. 341-353, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00719.2018>>.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; ROSENFELD, C. S.; ROBERTS, R. M. Effect of maternal obesity on estrous cyclicity, embryo development and blastocyst gene expression in a mouse model. **Human Reproduction**, v. 27, n. 12, p. 3513-3522, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humrep/des327>>.

BERTOLDO, M. J. *et al.* AMPK: a master energy regulator for gonadal function. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 2015a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00235>>.

BERTOLDO, M. J. *et al.* Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in murine oocytes alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, e0119680, 2015b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119680>>.

BIANCHI, C. *et al.* Prescribing exercise for prevention and treatment of gestational diabetes: review of suggested recommendations. **Gynecological Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 254-260, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1266474>>.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 58, n. 2, p. 560-567, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.560>>.

BILLINGSLEY, H. E.; CARBONE, S. The antioxidant potential of the Mediterranean diet in patients at high cardiovascular risk: an in-depth review of the PREDIMED. **Nutrition & Diabetes**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41387-018-0025-1>>.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>>.

BO', C. D. *et al.* Overview of human intervention studies evaluating the impact of the Mediterranean diet on markers of DNA damage. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu11020391>>.

BOCCARDI, V. *et al.* Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e62781, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062781>>.

BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. **Aging and Disease**, v. 6, n. 2, p. 109-120, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.14336/AD.2014.0305>>.

BOUZID, M. A. *et al.* Radical oxygen species, exercise and aging: an update. **Sports Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1245-1261, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40279-015-0348-1>>.

BRANNIAN, J. D. *et al.* Baseline non-fasting serum leptin concentration to body mass index ratio is predictive of IVF outcomes. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1819-1826, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1819>>.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>>.

BRINKMANN, C.; BRIXIUS, K. Erratum to: Peroxiredoxins and sports: new insights on the antioxidative defense. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 67, n. 5, p. 637-637, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12576-017-0551-y>>.

BROBERG, L. *et al.* Compliance with national recommendations for exercise during early pregnancy in a Danish cohort. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12884-015-0756-0>>.

BROTHERS, K. J. *et al.* Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 295-305, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.06.010>>.

BROWN, A. *et al.* Insulin-associated weight gain in obese type 2 diabetes mellitus patients: what can be done? **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 19, n. 12, p. 1655-1668, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/dom.13009>>.

BRUNET, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857-868, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)>.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485-501, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>>.

BURKHALTER, T. M.; HILLMAN, C. H. A narrative review of physical activity, nutrition, and obesity to cognition and scholastic performance across the human lifespan. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 201S-206S, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/an.111.000331>>.

BUSSEROLLES, J. *et al.* Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 337-342, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/BJNBJN2002524>>.

CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2276-2288, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/onc.2008.21>>.

CAMPOREZ, J. P. G. *et al.* Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1021-1028, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2012-1989>>.

CAMPS, J. (org.). **Oxidative stress and inflammation in non-communicable diseases**: molecular mechanisms and perspectives in therapeutics. Cham: Springer International Publishing, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0>>.

CARRIER, A. Metabolic syndrome and oxidative stress: a complex relationship. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 9, p. 429-431, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2016.6929>>.

CARTEE, G. D. *et al.* Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1034-1047, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.007>>.

CARTER, L. G. *et al.* Perinatal exercise improves glucose homeostasis in adult offspring. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 8, p. E1061-E1068, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00213.2012>>.

CARTONI, R. *et al.* Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise: Mitofusins 1/2 and ERR α expression in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 567, n. 1, p. 349-358, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.092031>>.

CARVALHO, K. F. *et al.* Mitofusin 1 is required for oocyte growth and communication with follicular somatic cells. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 6, p. 7644-7660, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.201901761R>>.

CASTRILLON, D. H. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, v. 301, n. 5630, p. 215-218, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1086336>>.

CELIS-MORALES, C. A. *et al.* Association between active commuting and incident cardiovascular disease, cancer, and mortality: prospective cohort study. **BMJ**, n. 357, p. j1456, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmj.j1456>>.

CHEN, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 189-200, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>>.

CHEN, J.; DOWNS, S. M. AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation in vitro. **Developmental Biology**, v. 313, n. 1, p. 47-57, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.043>>.

CHEN, J. *et al.* AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. **Developmental Biology**, v. 291, n. 2, p. 227-238, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.039>>.

CHIACCHIERA, F.; SIMONE, C. The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. **Cell Cycle**, v. 9, n. 6, p. 1091-1096, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11035>>.

CHOI, S.-L. *et al.* The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 1, p. 92-97, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5544>>.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of obesity: what have we learned? **Current Genomics**, v. 12, n. 3, p. 169-179, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138920211795677895>>.

COHEN, M. M; TARESTE, D. Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion. **F1000Research**, v. 7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.12688/f1000research.16629.1>>.

CONNOLLY, L. J. *et al.* Low-volume high-intensity swim training is superior to high-volume low-intensity training in relation to insulin sensitivity and glucose control in inactive middle-aged women. **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 10, p. 1889-1897, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00421-016-3441-8>>.

CONSTANTINI, N. W.; WARREN, M. P. Menstrual dysfunction in swimmers: a distinct entity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 9, p. 2740-2744, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/jcem.80.9.7673417>>.

CORDAIN, L. *et al.* Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 2, p. 341-354, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ajcn.81.2.341>>.

CORKEY, B. E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 4-13, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/db11-1483>>.

CRISTIANO, F. *et al.* Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 80, n. 2, p. 93-105, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)01561-Y](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)01561-Y)>.

CUTHBERTSON, D. J. *et al.* What have human experimental overfeeding studies taught us about adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and metabolic complications? **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 6, p. 853-865, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ijo.2017.4>>.

DAL MAGRO, B. M. *et al.* Developmental programming: intrauterine caloric restriction promotes upregulation of mitochondrial sirtuin with mild effects on oxidative parameters in the ovaries and testes of offspring. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 8, p. 763-773, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/RD19384>>.

DE HAAN, J. B. *et al.* Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 2, p. 283-292, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/hmg/5.2.283>>.

DE LA CERDA, P. *et al.* Effect of an aerobic training program as complementary therapy in patients with moderate depression. **Perceptual and Motor Skills**, v. 112,

n. 3, p. 761-769, 2011. Disponível em:

<<https://doi.org/10.2466/02.15.PMS.112.3.761-769>>.

DE MELO, G. B. *et al.* Early exposure to high-sucrose diet leads to deteriorated ovarian health. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 656831, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.656831>>.

DE OLIVERIA MELO, A. S. *et al.* Effect of a physical exercise program during pregnancy on uteroplacental and fetal blood flow and fetal growth: a randomized controlled trial. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 2 Part 1, p. 302-310, 2012.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31825de592>>.

DE SOUTO BARRETO, P. *et al.* Physical activity and incident chronic diseases: a longitudinal observational study in 16 European countries. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 52, n. 3, p. 373-378, 2017. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.amepre.2016.08.028>>.

DOWNS, S. M. Mouse versus rat: Profound differences in meiotic regulation at the level of the isolated oocyte: meiotic regulation in rodent oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 10-11, p. 778-794, 2011. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/mrd.21377>>.

DOWNS, S. M.; CHEN, J. Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 9, p. 1159-1168, 2006. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/mrd.20439>>.

DOWNS, S. M.; HUDSON, E. R.; HARDIE, D. G. A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 245, n. 1, p. 200-212, 2002. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0613>>.

DYE, T. D. *et al.* Physical activity, obesity, and diabetes in pregnancy. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 11, p. 961-965, 1997. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009223>>.

EATON, S. B.; KONNER, M. Paleolithic nutrition. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 5, p. 283-289, 1985. Disponível em:

<https://doi.org/10.1056/NEJM198501313120505>>.

ELIAS, A. N.; WILSON, A. F. Exercise and gonadal function. **Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 1747-1761, 1993. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137928>>.

ERION, K. A.; CORKEY, B. E. Hyperinsulinemia: a cause of obesity? **Current Obesity Reports**, v. 6, n. 2, p. 178-186, 2017. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s13679-017-0261-z>>.

FASANO, C. *et al.* FOXO3a from the nucleus to the mitochondria: a round trip in cellular stress response. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1110, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3390/cells8091110>>.

FEALY, C. E. *et al.* Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 3, p. 239-245, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01064.2013>>.

FERNANDEZ, M. O. *et al.* Obese neuronal PPAR γ knock-out mice are leptin sensitive but show impaired glucose tolerance and fertility. **Endocrinology**, v. 158, n. 1, p. 121-133, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2016-1818>>.

FOUCAUT, A.-M. *et al.* Sedentary behavior, physical inactivity and body composition in relation to idiopathic infertility among men and women. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, e0210770, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210770>>.

FÜZÉKI, E.; BANZER, W. Physical activity recommendations for health and beyond in currently inactive populations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 1042, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph15051042>>.

GARCIA, D.; SHAW, R. J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. **Molecular Cell**, v. 66, n. 6, p. 789-800, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>>.

GARN, S. M.; LEONARD, W. R. What did our ancestors eat? **Nutrition Reviews**, v. 47, n. 11, p. 337-345, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1989.tb02765.x>>.

GHAVIPOUR, M.; SOTOUDEH, G.; GHORBANI, M. Tomato juice consumption improves blood antioxidative biomarkers in overweight and obese females. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 805-809, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.10.012>>.

GILCA, M. *et al.* The oxidative hypothesis of senescence. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 53, n. 3, p. 207-213, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0022-3859.33869>>.

GIVIZIEZ, C. R. *et al.* Obesity and anovulatory infertility: a review. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 240-245, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160046>>.

GREEN, B. B. *et al.* Exercise as a risk factor for infertility with ovulatory dysfunction. **American Journal of Public Health**, v. 76, n. 12, p. 1432-1436, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.2105/AJPH.76.12.1432>>.

GREER, E. L. *et al.* The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 30107-30119, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M705325200>>.

GRINDLER, N. M.; MOLEY, K. H. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 8, p. 486-494, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molehr/gat026>>.

GUERRIERI, D.; MOON, H. Y.; PRAAG, H. v. Exercise in a pill: the latest on exercise-mimetics. **Brain Plasticity**, v. 2, n. 2, p. 153-169, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3233/BPL-160043>>.

HAEUSLER, R. A.; KAESTNER, K. H.; ACCILI, D. FoxOs function synergistically to promote glucose production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35245-35248, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.C110.175851>>.

HAKIMI, O.; CAMERON, L.-C. Effect of exercise on ovulation: a systematic review. **Sports Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1555-1567, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40279-016-0669-8>>.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>>.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, n. 6, p. 505-510, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/ard.54.6.505>>.

HALLIWELL, B. The chemistry of free radicals. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, n. 1-2, p. 1-21, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0748233793009001-203>>.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015.

HANSON, M. A.; POSTON, L.; GLUCKMAN, P. D. DOHaD – the challenge of translating the science to policy. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 3, p. 263-267, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S2040174419000205>>.

HANSON, M. A. *et al.* The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) recommendations on adolescent, preconception, and maternal nutrition: “Think Nutrition First”. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. S4, p. S213-S253, 2015. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(15\)30034-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(15)30034-5)>.

HARRIS, J. E.; BAER, L. A.; STANFORD, K. I. Maternal exercise improves the metabolic health of adult offspring. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 164-177, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.003>>.

HERRING, A. *et al.* Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 1, p. 117-128, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.11-193193>>.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R.; LIPPMAN, M. The influence of maternal diet on breast cancer risk among female offspring. **Nutrition**, v. 15, n. 5, p. 392-401, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(99\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(99)00029-5)>.

HOFFMAN, N. J. *et al.* Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 922-935, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.001>>.

HOHOS, N. M.; SKAZNIK-WIKIEL, M. E. High-fat diet and female fertility. **Endocrinology**, v. 158, n. 8, p. 2407-2419, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2017-00371>>.

HOUNSGAARD, M. L. *et al.* Maternal pre-pregnancy body mass index and pubertal development among sons. **Andrology**, v. 2, n. 2, p. 198-204, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00171.x>>.

HOUTKOOOPER, R. H. *et al.* The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 2, p. 194-223, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/er.2009-0026>>.

HÖZER, R. M. *et al.* Maternal exercise during pregnancy modulates mitochondrial function and redox status in a sex-dependent way in adult offspring's skeletal muscle. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, p. 1-8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S2040174421000209>>.

HSUEH, A. J. W. *et al.* Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-24, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>>.

HUANG, C. L.; SUMPIO, B. E. Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 207, n. 3, p. 407-416, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.02.018>>.

JACKSON, A.; ROBINSON, S. Dietary guidelines for pregnancy: a review of current evidence. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2b, p. 625-630, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/PHN2001146>>.

JACOBS, S. *et al.* The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. **Physiology & Behavior**, v. 129, p. 280-286, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.003>>.

JAMART, C. *et al.* Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. **American Journal of Physiology-**

Endocrinology and Metabolism, v. 305, n. 8, p. E964-E974, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00270.2013>>.

JAMES, P. T. *et al.* The worldwide obesity epidemic. **Obesity Research**, v. 9, n. S11, p. 228S-233S, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/oby.2001.123>>.

JANG, H. *et al.* Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 3, p. 336-347, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jpi.12316>>.

JAZWIEC, P. A.; SLOBODA, D. M. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 1, p. T51-T58, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/JOE-19-0048>>.

JELENIK, T.; RODEN, M. How estrogens prevent from lipid-induced insulin resistance. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 989-992, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2013-1112>>.

JOAQUIM, M.; ESCOBAR-HENRIQUES, M. Role of mitofusins and mitophagy in life or death decisions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.572182>>.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>>.

JOSEPH, A.-M.; ADHIHETTY, P. J.; LEEUWENBURGH, C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle: Effect of exercise-induced adaptations in muscle mitochondria with ageing. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5105-5123, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/JP270659>>.

JUNGHEIM, E. S. *et al.* Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 6, p. 1970-1974, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.154>>.

JUNGHEIM, E. S. *et al.* Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 4039-4046, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2010-0098>>.

JUNGHEIM, E. S.; MOLEY, K. H. Current knowledge of obesity's effects in the pre- and periconceptual periods and avenues for future research. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 203, n. 6, p. 525-530, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.043>>.

JURKOWSKI, J. E. *et al.* Ovarian hormonal responses to exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 44, n. 1, p. 109-114, 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/jappl.1978.44.1.109>>.

KAMINSKI, S. L. *et al.* Impact of maternal physical activity during gestation on porcine fetal, neonatal, and adolescent ovarian development. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 48, p. 56-61, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.01.006>>.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441-2449, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/db11-0425>>.

KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic cell failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1756-1760, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI29189>>.

KIHLSTRAND, M. *et al.* Water-gymnastics reduced the intensity of back/low back pain in pregnant women. **Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica**, v. 78, n. 3, p. 180-185, 1999.

KIM, M. K.; REAVEN, G. M.; KIM, S. H. Dissecting the relationship between obesity and hyperinsulinemia: role of insulin secretion and insulin clearance: hyperinsulinemia in obesity. **Obesity**, v. 25, n. 2, p. 378-383, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/oby.21699>>.

KITAOKA, Y. *et al.* Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 11, p. 1137-1142, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0184>>.

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, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1210-x>>.

KLEIN, C. P. *et al.* Swimming exercise before and during pregnancy: promising preventive approach to impact offspring's health. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 83-93, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.08.009>>.

KOPP, W. How Western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 2221-2236, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>>.

KUMAR, A. A. *et al.* Postprandial metabolism is impaired in overweight normoglycemic young adults without family history of diabetes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-57257-2>>.

LAI, H. *et al.* High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 5, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120063>>.

- LAKER, R. C. *et al.* Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00520-9>>.
- LANTIER, L. *et al.* AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 7, p. 3211-3224, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.14-250449>>.
- LAROSA, C.; DOWNS, S. M. Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 476-486, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057422>>.
- LEE, S.; DONG, H. H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 233, n. 2, p. R67-R79, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/JOE-17-0002>>.
- LEESE, H. J.; BARTON, A. M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 72, n. 1, p. 9-13, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720009>>.
- LEHTINEN, M. K. *et al.* A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 987-1001, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.046>>.
- LI, M.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2011/592408>>.
- LI, X.; KAZGAN, N. Mammalian sirtuins and energy metabolism. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 575-587, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.7150/ijbs.7.575>>.
- LIU, H. *et al.* FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, n. 4, p. 722-727, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.138>>.
- LIU, K. *et al.* Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, v. 299, n. 1, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.038>>.
- LOWTHER, K. M. *et al.* Embryonic poly(A)-binding protein is required at the preantral stage of mouse folliculogenesis for oocyte–somatic communication†. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 2, p. 341-351, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141234>>.

MA, X. *et al.* Leptin-Induced CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) is a novel intraovarian mediator of obesity-related infertility in females. **Endocrinology**, v. 157, n. 3, p. 1248-1257, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2015-1750>>.

MAGED, A. M. *et al.* Effect of swimming exercise on premenstrual syndrome. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 297, n. 4, p. 951-959, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00404-018-4664-1>>.

MAILLOUX, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **Redox Biology**, v. 4, p. 381-398, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.001>>.

MANDOLESI, L. *et al.* Effects of physical exercise on cognitive functioning and wellbeing: biological and psychological benefits. **Frontiers in Psychology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00509>>.

MANUEL-Y-KEENOY, B. *et al.* Time course of oxidative stress status in the postprandial and postabsorptive states in type 1 diabetes mellitus: relationship to glucose and lipid changes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 474-485, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719493>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.009>>.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.043>>.

MATSUDA, F. *et al.* Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 1, p. 151-158, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1262/jrd.10-124H>>.

MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 24-33, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002>>.

MAYES, M. A. *et al.* Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, p. 589-597, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057828>>.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)>.

MONNINKHOF, E. M.; PEETERS, P. H. M.; SCHUIT, A. J. Design of the sex hormones and physical exercise (SHAPE) study. **BMC Public Health**, v. 7, n. 1, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-232>>.

MORRIS, S. N. *et al.* Effects of lifetime exercise on the outcome of in vitro fertilization. **Obstetrics & Gynecology**, v. 108, n. 4, p. 938-945, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000235704.45652.0b>>.

MUNGAI, P. T. *et al.* Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 17, p. 3531-3545, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/MCB.05124-11>>.

NADAL-SERRANO, M. *et al.* Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER α /ER β ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 9, p. 2045-2051, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.07.002>>.

NAVYA, H.; YAJURVEDI, H. N. Obesity causes weight increases in prepubertal and pubertal male offspring and is related to changes in spermatogenesis and sperm production in rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 4, p. 815-823, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/RD15480>>.

NEMOTO, Y. *et al.* Altered expression of fatty acid–metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1819-1825, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI9575>>.

O'KEEFE, J. H.; GHEEWALA, N. M.; O'KEEFE, J. O. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 249-255, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.016>>.

O'NEILL, B. T. *et al.* FoxO transcription factors are critical regulators of diabetes-related muscle atrophy. **Diabetes**, v. 68, n. 3, p. 556-570, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/db18-0416>>.

ORTEGA, R. M. Dietary guidelines for pregnant women. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 6a, p. 1343-1346, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/PHN2001215>>.

OSMOND, C. *et al.* Early growth and death from cardiovascular disease in women. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1519-1524, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmj.307.6918.1519>>.

PELOSI, E. *et al.* Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms2861>>.

PEÑA-OYARZUN, D. *et al.* Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 61-78, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.084>>.

PERRY, C. G. R. *et al.* Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle: Molecular responses during mitochondrial biogenesis. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 23, p. 4795-4810, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199448>>.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2014/427318>>.

PIERCY, K. L. *et al.* The physical activity guidelines for Americans. **JAMA**, v. 320, n. 19, p. 2020-2028, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.2018.14854>>.

PLAS, David R.; THOMPSON, Craig B. AKT activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 12361-12366, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M213069200>>.

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/956792>>.

PONS, D. G. *et al.* Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on Eralpha/Erbeta ratio. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 5, p. 949-958, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.24737>>.

PREEYASOMBAT, C. *et al.* Racial and etiopathologic dichotomies in insulin hypersecretion and resistance in obese children. **The Journal of Pediatrics**, v. 146, n. 4, p. 474-481, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.12.014>>.

PRICE, B. B.; AMINI, S. B.; KAPPELER, K. Exercise in pregnancy: effect on fitness and obstetric outcomes – a randomized trial. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 44, n. 12, p. 2263-2269, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318267ad67>>.

QIU, S. *et al.* Exercise training improved insulin sensitivity and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, n. 12, p. 880-885, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-0029-1234119>>.

RADAK, Z. *et al.* Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling.

Antioxidants & Redox Signaling, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4498>>.

REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1126/science.1063443>>.

REYNOLDS, K. A. *et al.* Adverse effects of obesity and/or high-fat diet on oocyte quality and metabolism are not reversible with resumption of regular diet in mice.

Reproduction, Fertility and Development, v. 27, n. 4, p. 716-724, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/RD14251>>.

RICCI, E. *et al.* Pretreatment maternal lifestyle and outcomes of assisted reproduction: an Italian cohort study. **BMJ Open**, v. 10, n. 11, e038837, 2020.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038837>>.

RICHANI, D. *et al.* Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human**

Reproduction Update, v. 27, n. 1, p. 27-47, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa043>>.

RICHARDSON, M. C. *et al.* Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-

activated protein kinase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 670-677, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/jc.2008-2025>>.

RICH-EDWARDS, J. W. *et al.* Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. **Epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 184-190, 2002. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1097/00001648-200203000-00013>>.

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 2, p. 261-275, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/BJ20082055>>.

RIZZO, A. *et al.* Roles of reactive oxygen species in female reproduction: ROS and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344-352, 2012.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01891.x>>.

ROBERTS, R.; FRANKS, S.; HARDY, K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. **Human Reproduction**, v. 17, n. 11, p. 2950-

2956, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2950>>.

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

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.012>>.

RODRIGUEZ-CARO, H.; WILLIAMS, S. A. Strategies to reduce non-communicable diseases in the offspring: negative and positive *in utero* programming. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 6, p. 642-652, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S2040174418000569>>.

RUDERMAN, N. B. *et al.* AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 7, p. 2764-2772, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI67227>>.

RUIZ-RAMÍREZ, A. *et al.* High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 6, p. E1198-E1207, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00631.2010>>.

RUSSELL, D. L. *et al.* Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players? **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 62-68, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.019>>.

SAADAT, S. N. S. *et al.* Ovarian and uterine alterations following forced swimming: an immunohistochemical study. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 10, p. 629-636, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27921086/>>. Acesso em: 04 out. 2021.

SADOWSKA, J. *et al.* The impact of a diet containing sucrose and systematically repeated starvation on the oxidative status of the uterus and ovary of rats. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu11071544>>.

SAFDAR, A. *et al.* Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4135-4140, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1019581108>>.

SAHA, A. *et al.* AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 2014, n. 7, p. 241-253, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/DMSO.S43731>>.

SANTIQUET, N. *et al.* Activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase blocks cumulus cell expansion through inhibition of protein synthesis during *in vitro* maturation in swine. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116764>>.

SHEN, J. *et al.* Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. **Annual Review of Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 425-449, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-011215-025104>>.

SHKOLNIK, K. *et al.* Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1462-1467, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108>>.

SHOWALTER, M. R. *et al.* Obesogenic diets alter metabolism in mice. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, e0190632, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190632>>.

SIES, H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122-126, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>>.

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>>.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)>.

SILVESTRIS, E. *et al.* Obesity as disruptor of the female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 22, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z>>.

SKAZNIK-WIKIEL, M. E. *et al.* High-fat diet causes subfertility and compromised ovarian function independent of obesity in mice. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 5, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137414>>.

SMALL, L. *et al.* Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 314, n. 3, p. E251–E265, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2017>>.

SOHRABI, M. *et al.* Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. **Singapore Medical Journal**, v. 56, n. 10, p. 573-579, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.11622/smedj.2015085>>.

SONIGO, C. *et al.* AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 1, p. 1278-1287, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.201801089R>>.

SORRIENTO, D.; DI VAIA, E.; IACCARINO, G. Physical exercise: a novel tool to protect mitochondrial health. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.660068>>.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 1025-1078, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2008>>.

STONE, V. *et al.* Adaptive effects of gestational caloric restriction in the mitochondria of Wistar rats' brain: a DOHaD approach. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 79, n. 1, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.09.004>>.

STONE, V. *et al.* Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 138-148, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.02.002>>.

STONE, V. *et al.* Gestational caloric restriction with micronutrients supplementation does not delay development and promotes feeding behavior benefits. **Nutritional Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 770-780, 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1676972>>.

STONE, V. *et al.* Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. **Free Radical Research**, v. 50, n. 5, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10715762.2016.1152361>>.

STONE, V. *et al.* Swimming exercise enhances the hippocampal antioxidant status of female Wistar rats. **Redox Report**, v. 20, n. 3, p. 133-138, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000116>>.

STORLIEN, L. H. *et al.* Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and -3 fatty acids in muscle phospholipid. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 280-289, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/diab.40.2.280>>.

SURWIT, R. S. *et al.* Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v. 37, n. 9, p. 1163-1167, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>>.

SUSINI, C.; LAVAU, M. In-vitro and In-vivo responsiveness of muscle and adipose tissue to insulin in rats rendered obese by a high-fat diet. **Diabetes**, v. 27, n. 2, p. 114-120, 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/diab.27.2.114>>.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 266-269, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S2040174417000691>>.

SZUHANY, K. L.; BUGATTI, M.; OTTO, M. W. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. **Journal of Psychiatric Research**, v. 60, p. 56-64, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.10.003>>.

THE AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE OPINION (ACOG COMMITTEE OPINION). Physical activity and exercise during pregnancy and the postpartum period. **Obstetrics & Gynecology**, v. 135, n. 4, p. e178-e188, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003772>>.

TORTORIELLO, D. V.; MCMINN, J.; CHUA, S. C. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1238-1247, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2003-1406>>.

TOSCA, L. *et al.* Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 3, p. 452-465, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060848>>.

TOYAMA, E. Q. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. **Science**, v. 351, n. 6270, p. 275-281, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.aab4138>>.

TREWIN, A.; BERRY, B.; WOJTOVICH, A. Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. **Antioxidants**, v. 7, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox7010007>>.

TROY, K. *et al.* Exercise early and often: effects of physical activity and exercise on women's bone health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph15050878>>.

TSOULIS, M. W. *et al.* Maternal high-fat diet-induced loss of fetal oocytes is associated with compromised follicle growth in adult rat offspring. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135004>>.

VAINSHTEIN, A. *et al.* Role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 308, n. 9, p. C710-C719, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00380.2014>>.

VALLIM, A. L. *et al.* Water exercises and quality of life during pregnancy. **Reproductive Health**, v. 8, n. 1, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1742-4755-8-14>>.

VARGAS-ORTIZ, K.; PÉREZ-VÁZQUEZ, V.; MACÍAS-CERVANTES, M. H. Exercise and sirtuins: a way to mitochondrial health in skeletal muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20112717>>.

VARLAMOV, O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1147-1155, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.025>>.

VEGA, C. C. *et al.* Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 4, p. 712-719, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ijo.2013.150>>.

- VIÑA, J. *et al.* Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 14, p. 1369-1374, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.006>>.
- VOLK, K. M. *et al.* High-fat, high-sugar diet disrupts the preovulatory hormone surge and induces cystic ovaries in cycling female rats. **Journal of the Endocrine Society**, v. 1, n. 12, p. 1488-1505, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/js.2017-00305>>.
- VONA, R. *et al.* Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/8267234>>.
- WANG, N. *et al.* Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism**, v. 63, n. 1, p. 94-103, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.001>>.
- WANG, Q. *et al.* Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 10, p. 1603-1612, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/me.2009-0033>>.
- WANG, Y.-Q. *et al.* SIRT1 protects against oxidative stress-induced endothelial progenitor cells apoptosis by inhibiting FOXO3a via FOXO3a ubiquitination and degradation: sirt1 protects against oxidative stress-induced. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 9, p. 2098-2107, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcp.24938>>.
- WANG, Z.; YU, T.; HUANG, P. Post-translational modifications of FOXO family proteins. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 6, p. 4931-4941, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5867>>.
- WARREN, M. P.; PERLROTH, N. E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 3-11, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1677/joe.0.1700003>>.
- WASINSKI, F. *et al.* Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12986-015-0052-z>>.
- WHALEN, K. A. *et al.* Paleolithic and Mediterranean diet pattern scores are inversely associated with biomarkers of inflammation and oxidative balance in adults. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 6, p. 1217-1226, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.115.224048>>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the commission on ending childhood obesity**. [S. l.: s. n.], 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global recommendations on physical activity for health**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Promoting optimal fetal development: report of a technical consultation.** [S. l.: s. n.], 2006.

WU, C. *et al.* The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, e99155, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099155>>.

WU, L. L.-Y. *et al.* High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus–oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438-5445, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2010-0551>>.

WU, S. *et al.* Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v. 63, n. 4, p. 1270-1282, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/db13-1514>>.

YAN, S.; WANG, F.; SHI, Q. The effect of maternal high-fat-diet mediated oxidative stress on ovarian function in mice offspring. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/etm.2020.9264>>.

YANG, X. *et al.* Oxidative stress-mediated atherosclerosis: mechanisms and therapies. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00600>>.

YOSHIOKA, K. *et al.* Distinct roles of Zmynd17 and PGC1 α in mitochondrial quality control and biogenesis in skeletal muscle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00330>>.

ZEMVA, J. *et al.* Central FoxO3a and FoxO6 expression is down-regulated in obesity induced diabetes but not in aging. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 120, n. 06, p. 340-350, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-0031-1297970>>.

ZHANG, H. *et al.* Expression regulation and physiological role of transcription factor FoxO3A during ovarian follicular development. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595086>>.

ZHANG, M. *et al.* Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1799-3>>.

ZHANG, Q. *et al.* Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. **Neuroscience**, v. 205, p. 10-17, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.053>>.

ZHENG, J. *et al.* Maternal and paternal exercise regulate offspring metabolic health and beta cell phenotype. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 8, n. 1, e000890, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000890>>.

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto na CEUA/UFRGS



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: 36716

Título: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO SOBRE O ESTADO REDOX OVARIANO EM UM MODELO DE SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS INDUZIDO POR DIETA NA PROLE ADULTA

Vigência: 01/03/2019 à 28/02/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 01/03/2019

BARBARA MARINO DAL MAGRO - Aluno de Mestrado desde 01/03/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 27/05/2019 - Auditório Plenarinho- Saguão do Prédio da Reitoria- Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de Ratos Wistar adultos, fêmeas e machos de 120 dias. Serão utilizados 96 ratas fêmeas e 48 ratos machos (para acasalamento), além de 192 filhotes fêmeas oriundas das proles, todos provenientes do CREAL/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, Sexta-Feira, 7 de Junho de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – Regras de Publicação – “Journal of Ovarian Research”

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design
- list the full names and institutional addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval and for experimental studies involving client-owned animals, authors must also include a statement on informed consent from the client or owner.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]

- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in *BMC Research Notes*, you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support.

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Preparing figures

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order. Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.

- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

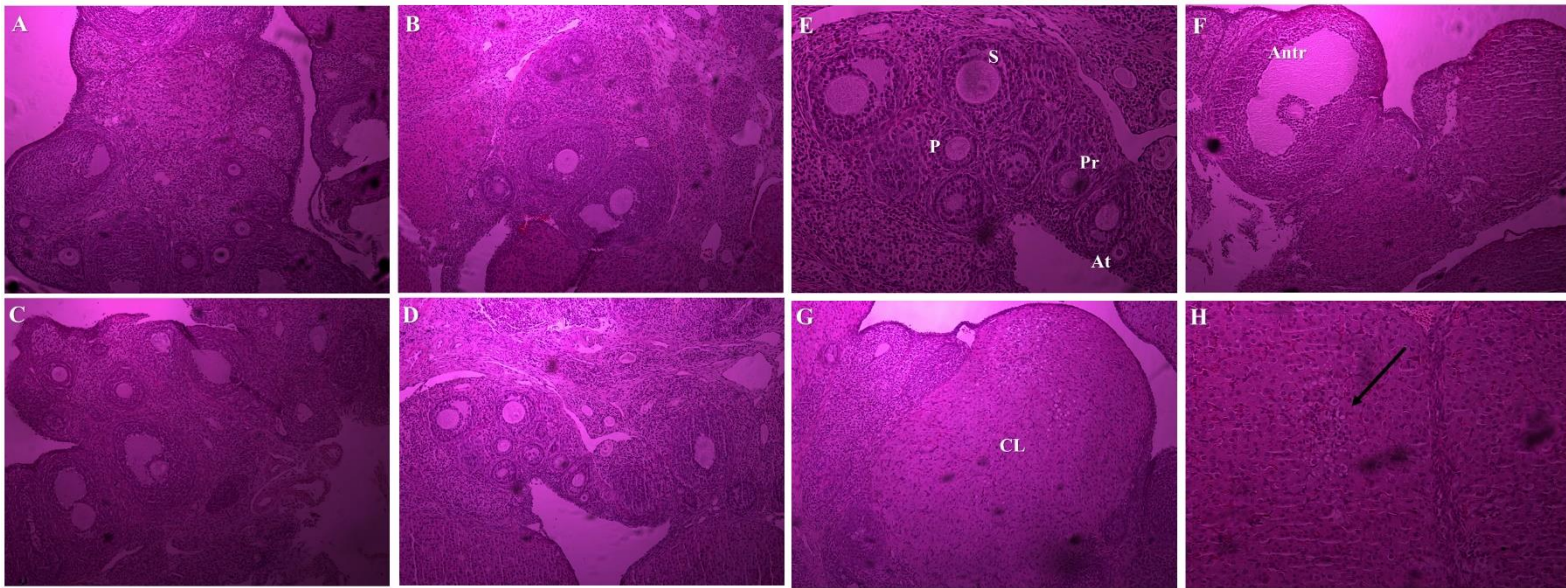
Figure file compression

- Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.
- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

APÊNDICE A – Material Suplementar do artigo científico

Table 1: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on offspring ovaries at 90 days of age follicle count number. Results are expressed as mean + SEM for n = 4-5. Results were analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's post-test

	Sedentary	Sedentary + HFHS	Exercise	Exercise + HFHS	p
Primordial	3.00 ± 2.45	2.25 ± 1.71	1.40 ± 0.89	1.00 ± 1.41	0.8343
Primary	2.60 ± 2.61	2.75 ± 1.26	2.00 ± 1.87	1.50 ± 1.73	0.7346
Secondary	2.40 ± 2.07	3.50 ± 1.73	2.40 ± 1.82	2.50 ± 1.91	0.5873
Antral	3.60 ± 3.13	3.50 ± 0.58	3.40 ± 1.52	1.75 ± 0.50	0.4025
Atretic	4.20 ± 1.79	4.50 ± 1.91	4.00 ± 1.41	3.25 ± 0.50	0.1504
Corporea	1.40 ±	2.00 ± 1.15	2.00 ±	1.00 ± 0.82	0.4799
lutea	0.79		1.41		



Supplemental Figure 1: Effect of maternal exercise and high-fat, high-sugar diet on offspring ovaries at 90 days of age from (A) sedentary animals, (B) sedentary + HFHS animals, (C) exercise animals, and (D) exercise + HFHS animals. Figure E demonstrates primordial follicle (Pr), primary follicle (P), secondary follicle (S), and atretic follicle (At). Figure F demonstrates antral follicle (Antr). Figure G demonstrates corporea lutea (CL). Figure H demonstrates morphological alterations such as vacuolization and blood infiltrate (black arrow). Figure 1A to 1D 10x and 1.5 exposure. Figure 1E to 1H 20x and 4.5 exposure. n = 4-5.