

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

Régis Mateus Hözer

**EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO ALTERA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E O
ESTADO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA PROLE DE RATAS WISTAR**

Porto Alegre

2020

Régis Mateus Hözer

**EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO ALTERA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E O
ESTADO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA PROLE DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Matté

Porto Alegre
2020

CIP - Catalogação na Publicação

Hözer, Régis Mateus
EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO ALTERA A FUNÇÃO
MITOCONDRIAL E O ESTADO REDOX NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DA PROLE DE RATAS WISTAR / Régis Mateus Hözer. --
2020.
107 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, 2020.

1. Exercício físico . 2. Estresse Oxidativo. 3.
Exercício físico durante a gestação. 4.
Desenvolvimento motor. 5. Exercício e gestação. I.
Matté, Cristiane, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Momentos como esse sempre tendem a fazer com que eu regresse praticamente toda minha vida e não somente o caminho percorrido durante a realização deste trabalho. O que torna a construção desse espaço um fenômeno ainda mais tenso, talvez pelo meu medo de ser injusto com alguém, por acreditar que todos que passaram pela minha vida foram imprescindíveis na construção do caminho até aqui, ou simplesmente pela minha inabilidade em expressar em palavras toda a gratidão para com todas essas pessoas.

Agradeço imensamente a minha família e a minha companheira Laísa. Por sempre terem me apoiado em todos os aspectos da vida, por sempre estarem dispostos a ajudar, por todo amor e tempo dedicado a mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço meus amigos do Laboratório 23, primeiramente por toda a parceria, amizade e por terem feito com que meus dias fossem muito mais leves e fáceis, esse trabalho também pertence a vocês.

Agradeço à minha orientadora Cristiane, pela oportunidade e por ser a fonte de tanto conhecimento que trago para minha vida hoje. Pelo espaço de crescimento, por ser uma professora e pesquisadora dedicada ao conhecimento e que anos atrás abriu as portas de seu laboratório para mim e me inseriu no mundo científico.

Agradeço a todos os amigos que fiz no departamento de bioquímica e fora dele, pelo auxílio e pelos momentos de descontração e amizade.

Agradeço aos meus mestres do Departamento de Bioquímica, pelos ensinamentos e por todo o conhecimento propiciado nesses últimos dois anos.

Agradeço a todos os trabalhadores e trabalhadoras do Departamento de Bioquímica e UFRGS que exercem com maestria seu trabalho, dando suporte a toda comunidade.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica e UFRGS pelo espaço de formação, pela excelência no ensino e na pesquisa científica.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES, FAPERGS e PROPESQ/UFRGS

Reitero, também, o agradecimento a todos que de uma maneira ou outra fizeram parte de minha trajetória.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E MÚSCULO ESQUELÉTICO	6
1.2. ESTADO REDOX E MITOCÔNDRIA	9
1.3. EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A GESTAÇÃO E AS ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA.....	12
1.4. DESENVOLVIMENTO MOTOR NO PERÍODO NEONATAL	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. CAPÍTULO I.....	24
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO 1.....	60
ANEXO 2.....	61

RESUMO

A gestação é um período fundamental do desenvolvimento fetal. Diversos estudos demonstram que o ambiente intrauterino, ao qual o feto é exposto, pode causar modulações benéficas ao organismo da prole. Assim, de acordo com o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença, o desenvolvimento de diversas doenças, ao longo da vida, tem como origem alterações causadas durante o período intrauterino. Considerando que existem evidências de que o exercício físico materno durante a gestação é capaz de causar alterações benéficas no organismo da prole, o objetivo desse estudo foi avaliar o desenvolvimento pós-natal (neuromotor e anatômico), bem como a função mitocondrial e o estado redox no músculo esquelético da prole. Para tanto, ratas Wistar adultas foram divididas em 3 grupos distintos: (1) sedentário, (2) exercício e (3) exercício com sobrecarga (2% peso corporal). Os grupos exercitados realizaram exercício de natação 30 min/dia, 5 dias/semana, iniciando uma semana antes do acasalamento até o final do período gestacional. Avaliamos na prole o desenvolvimento neuromotor através dos testes de endireitamento de superfície, geotaxia negativa, aversão à queda e suspensão em barra, bem como o desenvolvimento anatômico através da avaliação do peso, dia de abertura dos olhos e ouvido externo, aparecimento dos dentes incisivos superiores, desenvolvimento do pelo nos filhotes machos e fêmeas. Também avaliamos o conteúdo e a função mitocondrial e o estado redox, por meio da avaliação de defesas antioxidantes, bem como níveis de oxidantes e dano a proteínas na prole com 60 dias de vida. Nossos resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros neuromotores e anatômicos avaliados na prole. Por outro lado, para o conteúdo e a função mitocondrial, foi demonstrado um aumento nos machos e fêmeas, prole das ratas exercitadas com sobrecarga. Também observamos diferenças sexo-dependentes no estado redox entre machos e fêmeas prole das ratas exercitadas com sobrecarga durante a gestação. Em conclusão, o exercício físico em intensidade moderada, realizado durante a gestação, não acelera nem retarda o desenvolvimento anatômico e motor da prole. Todavia, o exercício físico em intensidade moderada durante a gestação aumenta o conteúdo e a atividade mitocondrial diferentemente entre machos e fêmeas, além de modular de maneira sexo-dependente o estado redox muscular da prole. Esses dados reforçam a

importância de realização de exercício físico antes e durante a gestação, a fim de trazer benefícios à prole.

ABSTRACT

Pregnancy is an important developmental period to the fetus. In accordance to the Developmental Origins of Health and Disease, the development of several diseases throughout offspring life originates by alterations during the intrauterine period. Considering that evidence suggests that maternal exercise during pregnancy can modulate the offspring organism in a beneficial way, our aim was to evaluate the post-natal neuro and anatomical development, the mitochondrial function and content, as well as the redox status on the adult offspring skeletal muscle. Adult female Wistar rats were divided into three groups: (1) sedentary, (2) exercise, and (3) overload exercise group (addiction of 2% corporal weight load). The exercised groups swam 30 mins/day, 5 days/week, one week before and throughout the pregnancy. We evaluated the neuromotor development through the surfacing righting, negative geotaxis, cliff avoidance and bar holding tests, so as the anatomical development through the evaluation of the weight, eyes opening day, pinna detachment, superior incisors eruption and fur development on male and female offspring. We also evaluated the mitochondrial function and content, and the redox status by antioxidant profile, total oxidant levels and protein damage. We observed no statistically differences between the groups or between sex in any of the neuromotor and physical landmark observations. Concerning to the mitochondrial function and content, we observed an improvement in the male and female pups born from overload exercised mothers. In addition, we also observed sex-dependent modulations in the redox status between male and female pups born from overload exercised mothers. In conclusion, moderate intensity exercise during pregnancy do not accelerate or delay neuromotor and anatomical development on the offspring. On the other hand, physical exercise during pregnancy increased mitochondrial content and function in the skeletal muscle, and modulated the redox status on the offspring in a sex-dependent way. Our data reinforces the importance of maternal exercise, bringing health benefits to the next generation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

AGE - Produtos de glicação avançada (do inglês, *advanced glycation endproducts*)

CAT - Catalase

DCFH - Diclorofluoresceína

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOHaD - Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*)

ERs - Espécies reativas

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FAD⁺ - Flavina adenina dinucleotídeo

GLO1 - Glioxalase 1

GPx - Glutaciona-peroxidase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

MDA - Malondialdeído

MG - Metilglioxal

MHC - Cadeia pesada da miosina

NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADPH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido

DPN - Dia pós-natal

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido-dismutase

STEM – Sistema de transporte de elétrons mitocondrial

1. INTRODUÇÃO

1.1. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E MÚSCULO ESQUELÉTICO

Cerca de 40% do nosso peso corporal corresponde à musculatura esquelética. Além disso, 20 a 30% de nosso gasto energético em repouso é atribuído a esse tecido e esse gasto sobe para 90% quando realizamos algum tipo de exercício físico (MIKOVIC e LAMON, 2018). Após uma refeição, cerca de 50% da glicose é captada pelo músculo esquelético, além do mesmo possuir capacidade quatro vezes maior que o fígado em armazenar glicogênio (EGAN e ZIERATH, 2013; MIKOVIC e LAMON, 2018). A literatura vem gradualmente ampliando e fortalecendo a importância desse tecido para a saúde e prevenção de diversas doenças (BAYOL, BRUCE e WADLEY, 2014; PATTANAKUHAR *et al.*, 2017). Além disso, os músculos são o alvo principal do exercício físico e das adaptações decorrentes dele (VINA *et al.*, 2012). Assim sendo, diversos estudos já demonstraram efeitos benéficos do exercício sobre o metabolismo, como diminuição da resistência à insulina, melhora na tolerância à glicose e na capacidade de armazenamento de nutrientes. Esses efeitos, de uma forma ou de outra, estão intrinsecamente relacionados ao músculo, evidenciando sua importância para a saúde e para o metabolismo de diversos tecidos (BAYOL, BRUCE e WADLEY, 2014; HUGHES, ELLEFSEN e BAAR, 2018; MIKOVIC e LAMON, 2018).

A musculatura esquelética de mamíferos é composta principalmente por dois tipos de fibras musculares: as fibras dos tipos I e II, classificadas a partir de suas características contráteis (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013; PATTANAKUHAR *et al.*, 2017). As características metabólicas e contráteis coincidem, sendo as fibras do tipo I predominantemente oxidativas (maior conteúdo de mioglobina e mitocôndrias) e de contração lenta (baixa atividade ATPásica da

miosina), enquanto as fibras do tipo II são predominantemente glicolíticas (menor conteúdo de mioglobina e mitocôndrias) e de contração rápida (alta atividade ATPásica da miosina) (EGAN e ZIERATH, 2013; PATTANAKUHAR *et al.*, 2017). Existem também subclassificações para os tipos de fibras, classificadas como IIx e IIa, além de uma forma IIb encontrada principalmente em roedores. As fibras do tipo IIx e IIb são predominantemente glicolíticas, enquanto fibras IIa são intermediárias (apresentando características tanto oxidativas como glicolíticas em proporções similares) (EGAN e ZIERATH, 2013; PATTANAKUHAR *et al.*, 2017). Outra forma de classificar os tipos de fibra considera a composição proteica das mesmas, avaliando as propriedades contráteis da cadeia pesada da miosina (MHC do inglês *myosin heavy chain*), que são classificadas de forma similar às apresentadas anteriormente em tipos I (MHC I) e II (MHC II, MHC IIx e MHC IIa) presentes em fibras do tipo I (oxidativas) e II (glicolíticas), respectivamente (EGAN e ZIERATH, 2013). A maior parte dos músculos de nosso corpo possui todos os tipos de fibras, porém, em diferentes proporções (ZIERATH e HAWLEY, 2004), sendo possível atribuir a um músculo ou grupamento muscular características predominantemente oxidativas ou glicolíticas.

A musculatura esquelética é um tecido altamente plástico e pode adaptar-se diferentemente dependendo da modalidade praticada, da intensidade, do volume, da disponibilidade de substratos e, até mesmo, sobre circunstâncias patológicas (EGAN e ZIERATH, 2013; HUGHES, ELLEFSEN e BAAR, 2018; PATTANAKUHAR *et al.*, 2017; ZIERATH e HAWLEY, 2004). De forma genérica, os exercícios físicos podem ser categorizados como aeróbicos/endurance e resistidos/força (EGAN e ZIERATH, 2013). Os exercícios aeróbicos geralmente são realizados de forma contínua e duração prolongada, ao passo que os exercícios resistidos/força são realizados de

forma intermitente, com menor duração (EGAN e ZIERATH, 2013; HUGHES, ELLEFSEN e BAAR, 2018). Apesar de serem simples e de a literatura apresentar exceções às características citadas, essa classificação consegue nos dar subsídio suficiente para discutirmos as adaptações no músculo esquelético como resposta ao exercício aeróbico

Os exercícios aeróbicos têm como principal característica um maior consumo de oxigênio durante e após sua realização, em decorrência da predominância do metabolismo oxidativo mitocondrial (EGAN e ZIERATH, 2013). Por esse motivo, os principais efeitos adaptativos desse tipo de exercício são a melhora da capacidade cardiorrespiratória¹ e a biogênese mitocondrial², extensivamente reportados em diversos estudos (HUGHES, ELLEFSEN e BAAR, 2018; JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010; LAAKSONEN *et al.*, 2002). A mitocôndria é um componente fundamental e principal responsável pela capacidade oxidativa celular (CAMPS *et al.*, 2016). Dessa forma, tanto o conteúdo quanto a função mitocondrial, aumentados pelos exercícios aeróbicos, implicam diretamente na capacidade da célula em produzir ATP e, conseqüentemente, de exercer suas funções. Além disso, a diminuição da capacidade cardiorrespiratória e a disfunção mitocondrial são parâmetros comumente encontrados em diversas doenças não comunicáveis, como a obesidade, diabete mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (CAMPS *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ-AGUILERA *et al.*, 2013; JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010; LAAKSONEN *et al.*, 2002; MYERS *et al.*, 2004). Esses dados reforçam a importância dos efeitos adaptativos decorrentes dos exercícios aeróbicos, tanto para a

¹ Capacidade cardiorrespiratória é definida como a capacidade do indivíduo em captar, transportar e utilizar oxigênio, em uma ação conjunta do sistema cardiovascular e músculo esquelético (HUGHES, ELLEFSEN e BAAR, 2018).

² Biogênese mitocondrial é caracterizada como o aumento da massa e do conteúdo mitocondrial (JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010).

manutenção da saúde quanto para a prevenção no desenvolvimento de doenças relacionadas ao metabolismo.

1.2. ESTADO REDOX E MITOCÔNDRIA

O oxigênio é um gás fundamental para a vida, sendo necessário a todos os animais para produção de ATP na mitocôndria (HALLIWELL, 2006; KALYANARAMAN, 2013). Por sua vez, a mitocôndria é responsável pela utilização de cerca de 80% do O₂ que absorvemos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). No metabolismo energético, as reações de oxidorredução são necessárias para transferir elétrons de compostos mais reduzidos para as coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Assim, em seu estado reduzido, essas coenzimas são as principais doadoras de elétrons para o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (STEM), que as utiliza para criar um fluxo de elétrons, que possibilita o bombeamento de prótons do espaço intermembranas para a membrana mitocondrial interna, ressintetizando ATP. Nesse processo, é natural que aconteça o vazamento de elétrons que, por sua vez, podem reagir com o O₂ e formar espécies reativas de oxigênio (ERO). Devido à estrutura química do O₂ que, por possuir dois elétrons desemparelhados em sua camada de valência mais externa, tem a sua reação facilitada com os elétrons vazados e também com outras espécies reativas, o que pode causar dano a diversas biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

As espécies reativas (ERs), segundo Halliwell e Gutteridge (2015), podem ser divididas como radicais livres ou não radicais, capazes de existir de forma independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados e, que podem ser

derivados de diversas fontes, como oxigênio, nitrogênio, bromo e cromo, por exemplo.

As principais ERO são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) e podem ser produzidas em diversos compartimentos intracelulares, como a própria mitocôndria, retículo endoplasmático e os peroxissomos, por exemplo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). O $O_2^{\cdot-}$, por sua vez, é formado a partir da redução do O_2 , principalmente no STEM, ou por reações catalisadas por enzimas como as NADPH-oxidases, xantina-oxidases, NOS-sintases, e diversos outros agentes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ possui uma meia vida curta e não consegue ultrapassar membranas, podendo então reagir com outras biomoléculas e ERs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Já o H_2O_2 é principalmente formado a partir do $O_2^{\cdot-}$ pela reação catalisada pela superóxido-dismutase (SOD) e possui meia vida mais longa comparada ao $O_2^{\cdot-}$, sendo mais estável. Porém, o H_2O_2 tem a capacidade de atravessar membranas, e também de reagir com íons de metal como Fe^{2+} ou Cu^+ , na reação de Fenton e formar $\cdot OH$ que, por sua vez, é potencialmente o mais danoso entre as ERO citadas, dada sua meia vida curta, além de não possuir nenhuma defesa antioxidante enzimática para neutralizá-la (KALYANARAMAN, 2013).

Está bem estabelecido que os oxidantes podem causar dano a diversas biomoléculas, como lípideos, aminoácidos e ácidos nucleicos (KALYANARAMAN, 2013; POWERS, RADAK e JI, 2016; VIÑA *et al.*, 2000). Há, aproximadamente, quatro décadas foi definido, pela primeira vez, o conceito de “estresse oxidativo”, definido como “uma perturbação no balanço entre a produção e neutralização dos oxidantes, em favor dos oxidantes” (POWERS, RADAK e JI, 2016; SIES, 2015). Entretanto, com o avanço das pesquisas, esse conceito foi evoluindo e hoje é

definido como “um desequilíbrio entre a produção e a neutralização dos oxidantes, em favor dos oxidantes, que leva a uma perturbação na sinalização redox, causando dano à célula” (POWERS, RADAK e JI, 2016; SIES, 2015). Atualmente, o “estresse oxidativo” pode ser configurado quando o desequilíbrio entre a produção e a neutralização é capaz de produzir danos à célula, diferentemente da primeira definição. Assim, para que não haja dano proveniente dos oxidantes é necessário um sistema que mantenha a homeostase, e isso é realizado por meio de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Essas possuem a capacidade de neutralizar ou diminuir a reatividade dos oxidantes, doando elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Entre as defesas enzimáticas, podemos citar a enzima SOD, encontrada em diferentes isoformas: a MnSOD (presente na matriz mitocondrial), a CuZnSOD (presente no citoplasma) e também a EcSOD (presente no espaço extracelular); a catalase (CAT), presente em grandes quantidades nos peroxissomos e a glutaciona-peroxidase (GPx), que contém mais de oito isoformas distribuídas em diversos compartimentos celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Já entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, podemos citar como principal fonte endógena a glutaciona reduzida (GSH), que tem a capacidade de reduzir o $\cdot\text{OH}$ e também participar de diversas reações catalisadas por enzimas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A SOD tem como função catalisar a reação de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 e O_2 . Já a CAT e a GPx têm como função a decomposição do H_2O_2 em H_2O . Porém, a GPx utiliza GSH em sua reação, liberando GSSG, forma oxidada da GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; POWERS *et al.*, 2011). Outra enzima que está abundantemente expressa no músculo esquelético é a enzima glioxalase I (GLOI), que faz parte do sistema das glioxalases (MEY e HAUS, 2018). Todavia, a GLOI não

atua sobre oxidantes, mas sobre o hemitioacetal, formado a partir da reação da GSH com o metilglioxal (MG) que, por sua vez, é formado espontaneamente a partir de intermediários glicolíticos, como a gliceraldeído-3-fosfato e alternativamente através da peroxidação lipídica (MEY e HAUS, 2018; THORNALLEY, 2003). O MG é um conhecido precursor de produtos de glicação avançados (AGEs, do inglês *advanced glycation endproducts*), capaz de modificar proteínas e nucleotídeos e induzir a produção de ROS (DISTLER e PALMER, 2012; MEY e HAUS, 2018). Assim, o sistema das glicoxalases atua destoxificando o MG em um subproduto mais estável, evitando possíveis danos a biomoléculas (DISTLER e PALMER, 2012; MEY e HAUS, 2018; THORNALLEY, 2003).

É sabido que o exercício físico aumenta a produção de ROS pela mitocôndria e que esses oxidantes produzidos podem causar danos celulares induzindo estresse oxidativo (POWERS *et al.*, 2011; VIÑA *et al.*, 2000). Porém, nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram que as ROS desempenham um papel importante na sinalização celular, induzindo modulações benéficas como o aumento da expressão de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em diversos tecidos, bem como estimulando a biogênese mitocondrial (JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010; MARCELINO *et al.*, 2013; STONE *et al.*, 2019; VINA *et al.*, 2012). Assim, o aumento da produção de ROS induzido pelo exercício são tidas como as responsáveis por diversos efeitos adaptativos do mesmo, o que nos sugere um excelente tópico de investigação acerca do estado redox, dado o fato de que estudos já demonstraram que o exercício materno durante a gestação foi capaz de modular as defesas antioxidantes e a biogênese mitocondrial da prole (MARCELINO *et al.*, 2013).

1.3. EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE A GESTAÇÃO E AS ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA

A prática sistemática de exercícios físicos traz uma série de benefícios a seus praticantes, independentemente da população, sejam eles diabéticos, hipertensos, ou indivíduos em condições fisiológicas normais. A realização de exercícios físicos por gestantes não foge a essa prerrogativa. Segundo as recomendações do *American College of Sports Medicine* (2017) e do *European Guidelines on cardiovascular prevention in clinical practice* (2016), é indicada a realização de pelo menos 30 minutos de exercícios diários para que as gestantes venham a se valer dos efeitos benéficos da prática regular de exercício físico. Sendo essas recomendações passíveis de serem estendidas para gestantes que não possuam complicações médicas graves (COMMITTEE ON OBSTETRIC, 2015).

Está bem estabelecido que o exercício físico aeróbico em intensidade leve à moderada, praticado durante a gestação, é seguro e indicado para as gestantes. Diversos benefícios decorrentes da prática sistemática de exercícios durante a gestação foram evidenciados, tais como a prevenção do desenvolvimento de diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e hipertensão, bem como o auxílio no controle de ganho de peso durante o período de gestação, visto que um aumento excessivo de peso pode resultar em problemas obstétricos e influenciar no desenvolvimento do feto (COMMITTEE ON OBSTETRIC, 2015; FERRARO, GAUDET e ADAMO, 2012; MOYER *et al.*, 2016; SCHLUSSEL *et al.*, 2008).

De acordo com o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*), o desenvolvimento de diversas doenças ao longo da vida tem como origem alterações causadas durante o período intrauterino. Essas alterações são diretamente influenciadas por variáveis, como ambiente, estilo de vida da mãe, bem como seus aspectos fisiológicos, podendo alterar a suscetibilidade da prole ao desenvolvimento

de doenças, causando alterações e adaptações que podem perdurar até a vida adulta (BALE *et al.*, 2010; BHARATHI *et al.* 2012; BLAIZE *et al.* 2015; ECLARINAL *et al.*, 2016; MARCELINO *et al.*, 2013; MCCLOSKEY *et al.* 2016).

Como mencionado anteriormente, a melhora da capacidade oxidativa e biogênese mitocondrial são efeitos conhecidos do exercício aeróbico sobre a musculatura esquelética (LAAKSONEN *et al.*, 2002; LANDEN *et al.*, 2019). Nesse sentido, um estudo realizado por AMORIM *et al.* (2009) demonstrou que ratas grávidas que se exercitaram, submetidas ou não à dieta hipoproteica durante a gestação, tiveram um aumento na capacidade cardiorrespiratória, independentemente da dieta. Além disso, foi também constatado que a prole das ratas exercitadas e submetidas à dieta foram protegidas dos efeitos deletérios da mesma. Assim, esses dados demonstram que mesmo durante a gestação o exercício pode causar efeitos benéficos na musculatura esquelética e aumentar a capacidade oxidativa muscular das gestantes, além de proteger a prole dos malefícios decorrentes da dieta.

Em uma revisão, CLAPP (2006) também aponta que o exercício físico realizado em intensidade moderada durante o período gestacional melhora o desenvolvimento da placenta e que essa melhora afeta positivamente o desenvolvimento do feto. Em outro estudo, CLAPP *et al.* (2000) evidenciaram que filhos de mães que se exercitaram durante a gestação nasceram maiores e mais pesados, além de possuírem maior proporção de massa magra que filhos de mães que não se exercitaram durante a gravidez. Juntos, esses achados indicam que há uma melhora no desenvolvimento intrauterino do feto como efeito do exercício físico realizado pela mãe. Além disso, outros estudos já mostraram que o exercício físico materno durante a gestação previne nascimentos prematuros e o baixo peso ao

nascer, ambos fatores influenciam diretamente a saúde, a sobrevivência e o desenvolvimento dos neonatos (PAPALIA e FELDMAN, 2012; TAKITO e BENÍCIO, 2010).

Além do mais, tem aumentado expressivamente o número de estudos demonstrando os efeitos benéficos do exercício físico materno durante a gestação sobre a saúde da prole. Diversos efeitos benéficos do exercício materno são pronunciados nos filhos, como efeitos cognitivos, funcionais, metabólicos e morfológicos, verificados desde o período neonatal até a vida adulta dos mesmos (AKHAVAN *et al.*, 2008; CLAPP *et al.*, 2000; LEMOYNE *et al.*, 2012; MARCELINO *et al.*, 2013; PARÍZKOVÁ, 2017).

Diversos estudos demonstram que o exercício materno realizado durante a gestação modula o desenvolvimento cerebral da prole. Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, demonstramos que filhotes de ratas exercitadas durante a gestação possuem melhores defesas antioxidantes em diversas regiões do encéfalo (MARCELINO *et al.*, 2013). Além de maior densidade mitocondrial aos sete dias de vida, o que confere maior neuroproteção e maior capacidade oxidativa no encéfalo da prole (MARCELINO *et al.*, 2013). Além do mais, outros estudos já mostraram maior neurogênese hipocampal, maiores níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), bem como maior capacidade de memória e aprendizado na prole de ratas exercitadas durante a gestação (AKHAVAN *et al.*, 2008; AKHAVAN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2006). Outros estudos demonstram que o exercício realizado pela mãe durante a gestação protege a prole contra diversos insultos ao longo da vida. Nesse sentido, já foi demonstrado maior resistência contra o desenvolvimento de obesidade, Doença de Alzheimer, resistência à insulina, danos oxidativos, além de proteção contra atrasos no desenvolvimento neuromotor (FALCÃO-TEBAS *et al.*,

2011; GIRIKO *et al.*, 2013; HERRING *et al.*, 2012; KLEIN *et al.*, 2019; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014; WASINSKI *et al.*, 2015).

Entretanto, estudos diretamente relacionados aos efeitos do exercício materno sobre a musculatura esquelética e o desenvolvimento neuromotor da prole, ambos focos de nosso trabalho, ainda são substancialmente escassos. Todavia, existem algumas evidências em estudos clínicos que demonstram que o exercício físico materno afeta positivamente o desenvolvimento neuromotor, cognitivo e morfológico dos filhos. Esses estudos evidenciam que os filhos de mães exercitadas nascem maiores, porém mais leves e com menor percentual de gordura que filhos de mães sedentárias, o que denota um melhor desenvolvimento intrauterino dos mesmos (CLAPP, 1996). Ainda, outros estudos mostram que os filhos têm melhor desenvolvimento morfométrico e neuromotor, além de apresentarem melhores resultados em testes que avaliam a inteligência geral e a linguagem oral, o que demonstra um melhor desenvolvimento cerebral dos mesmos (CLAPP, 1996; CLAPP 1998; CLAPP, LOPES e HARCAR-SEVIK, 1999). Além disso, em outro estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a prole de ratas exercitadas durante a gestação alcança o estágio mais maduro de locomoção mais rapidamente do que a prole de ratas sedentárias durante o período gestacional (KLEIN *et al.*, 2018).

Em conjunto, esses dados evidenciam o exercício físico como potencial ferramenta de intervenção terapêutica durante o período gestacional, capaz de causar diversas modulações benéficas não somente nas gestantes mas também em seus filhos. Contudo, estudos que buscam avaliar o músculo esquelético da prole de ratas exercitadas são escassos, dessa forma, pouco se sabe sobre os efeitos do exercício materno sobre a capacidade oxidativa muscular da prole, bem como sobre

o estado redox no músculo dos mesmos. Além disso, a literatura é ainda muito mais escassa em relação a dados dos efeitos do exercício materno entre os machos e fêmeas da prole, dado o fato de que a maioria dos estudos médicos e sobre exercício são conduzidos somente em machos, o que gera uma profunda lacuna nessas áreas do conhecimento (COSTELLO, BIEUZEN e BLEAKLEY, 2014).

1.4. DESENVOLVIMENTO MOTOR NO PERÍODO NEONATAL

Outros parâmetros que influenciam a saúde e o desenvolvimento da prole é a ontogenia dos reflexos neuromotores e o desenvolvimento físico anatômico da prole. A ontogenia do desenvolvimento, tanto anatômico como neuromotor, sofre a influência da hereditariedade e do ambiente, ou seja, de traços inatos e adquiridos dos pais biológicos e também fortemente influenciados pelo ambiente a qual o organismo foi exposto, mesmo durante a fase intrauterina, de forma indireta, pela mãe e seus hábitos de vida (PAPALIA e FELDMAN, 2012; MOYER *et al.*, 2016). Uma forma de acessar o neurodesenvolvimento no período neonatal da prole, é através da análise da ontogenia dos reflexos neuromotores e de aspectos físicos anatômicos que, segundo De Castro (1995) e De Castro *et al.* (2007), são considerados como sensíveis biomarcadores do neurodesenvolvimento.

Segundo Papalia e Feldman (2012), o estudo sobre o desenvolvimento humano se dá em três aspectos: físico, cognitivo e psicossocial. Em síntese, o aspecto físico engloba o crescimento do corpo e dos órgãos, bem como suas capacidades sensoriais e motoras. O cognitivo trata da aprendizagem, da memória, da linguagem, do raciocínio e da criatividade, já o psicossocial trata das emoções, da personalidade e das relações pessoais (PAPALIA e FELDMAN, 2012). Além disso, é importante ressaltar que todos os aspectos oferecem influência uns sobre os outros, tornando o desenvolvimento um processo complexo e dinâmico (PAPALIA

e FELDMAN, 2012). Contudo, trataremos nesta parte com maior exclusividade sobre o desenvolvimento físico, que engloba tanto o desenvolvimento anatômico como o neuromotor.

O desenvolvimento físico anatômico pode ser dividido em períodos de faixa etária, que vão desde a vida intrauterina até a vida adulta tardia (PAPALIA e FELDMAN, 2012). Já o desenvolvimento neuromotor, segundo Gallahue, Ozmun e Goodway (2013), são divididos por fases ou estágios de desenvolvimento, definidos a partir de alterações no comportamento motor dos indivíduos, resumidos e exemplificados na **figura 1**.

Contudo, nosso estudo foi conduzido em roedores e os estágios de desenvolvimento propostos anteriormente não conseguem ser relacionados em sua totalidade com o desenvolvimento físico dos roedores. Assim sendo, o desenvolvimento neuromotor de ratos compreende três estágios avaliados a partir de seu comportamento motor (ALTMAN E SUDARSHAN, 1975). O primeiro estágio é chamado de pivô (*pivoting*). Nesse estágio, o animal somente consegue realizar movimentos em torno do próprio eixo, girando. Esse comportamento é inicialmente e mais comumente observado do dia pós-natal 2 ao 7 (PN2-PN7). O segundo estágio é caracterizado pelo rastejar (*crawling*). Esse estágio se desenvolve à medida que o animal adquire maior controle dos músculos do pescoço, o que o possibilita levantar a cabeça do solo. A partir desse estágio, o animal consegue realizar os primeiros passos que, embora arrastados, denotam um maior controle do pescoço e dos membros anteriores. Esse estágio começa a ser observado com maior frequência a partir de DPN7 até por volta de DPN11. O terceiro e último estágio compreende a caminhada (*walking*). Nesse estágio, o animal já possui a capacidade de sustentar todo o corpo longe do solo, possibilitando maior liberdade para dar passos com

todas as patas, iniciando por volta de DPN12, chegando ao estágio mais maduro próximo de DPN15. Assim, tanto em humanos como em roedores, os estágios de comportamento se desenvolvem e se alteram gradualmente e devem passar por todos os estágios até adquirirem a competência motora do estágio mais maduro (GALLAHUE, OZMUN E GOODWAY, 2013).

Nesse sentido, a fase do movimento reflexa, tanto em humanos como em roedores, é tida como a forma dos bebês obterem informações sobre o ambiente, além de constituírem a base para todos os movimentos planejados das fases posteriores e mais avançadas. Essa fase é composta, basicamente, por movimentos realizados involuntariamente, controlados subcorticalmente e desencadeados como resposta a algum estímulo do ambiente (GALLAHUE, OZMUN e GOODWAY, 2013; PAPALIA e FELDMAN, 2012).

A fase do movimento reflexa, segundo Gallahue, Ozmun e Goodway (2013), pode ser categorizada em três tipos de reflexos: primitivos, posturais e locomotores. Estudos relatam que os comportamentos reflexos estão presentes desde a fase intrauterina, em humanos, desde o 5º mês de gestação e no 16º dia de gestação em ratos, além de se desenvolverem de forma similar (ALTMAN e SUDARSHAN, 1975; GALLAHUE, OZMUN e GOODWAY, 2013; NARAYANAN, FOX e HAMBURGER, 1971; PAPALIA e FELDMAN, 2012).

Os reflexos primitivos são comportamentos relacionados à sobrevivência e proteção e podem ser observados através do teste de aversão à queda em ratos, ou reflexo de sucção em humanos, por exemplo (FOX, 1965; PAPALIA e FELDMAN, 2012). À medida que o cérebro se desenvolve, começa o desenvolvimento dos reflexos posturais, que são desencadeados a partir de mudanças percebidas na posição do corpo. Os reflexos posturais em ratos podem ser observados através do

teste de endireitamento de superfície (ALTMAN e SUDARSHAN, 1975; HEYSER, 2004; PAPALIA e FELDMAN, 2012). Por último, surgem os reflexos locomotores, sendo comportamentos reflexos que mais assemelham-se com os estágios de movimento voluntário posteriormente. Podendo ser acessado em ratos através do teste de geotaxia negativa (ALTMAN e SUDARSHAN, 1975; HEYSER, 2004; PAPALIA e FELDMAN, 2012).

Segundo Papalia e Feldman (2012), a maioria dos reflexos desaparece durante os primeiros seis a doze meses de vida em humanos, ou seja, existe também um período que é chamado de fase de desaparecimento, como o nome sugere, alguns reflexos primitivos e locomotores desaparecem, dando lugar aos movimentos realizados de forma voluntária, em razão do desenvolvimento do córtex motor, da mielinização e da sinaptogênese. No entanto, roedores não demonstram passar pelo período de desaparecimento dos reflexos locomotores, demonstrando o comportamento locomotor similar à de um adulto já por volta do DPN16 (ALTMAN e SUDARSHAN, 1975; GRAMSBERGEN, 2001; NARAYANAN, FOX e HAMBURGER, 1971; WOOD, BEYER E CAPPON, 2003).

Nesse sentido, tendo em vista que o desenvolvimento neuromotor está intimamente ligado ao desenvolvimento cerebral, e que o mesmo pode ser influenciado pelo ambiente intrauterino, a avaliação do desenvolvimento da prole revela-se uma ferramenta eficaz para avaliar efeitos de diferentes intervenções realizadas durante a gestação.

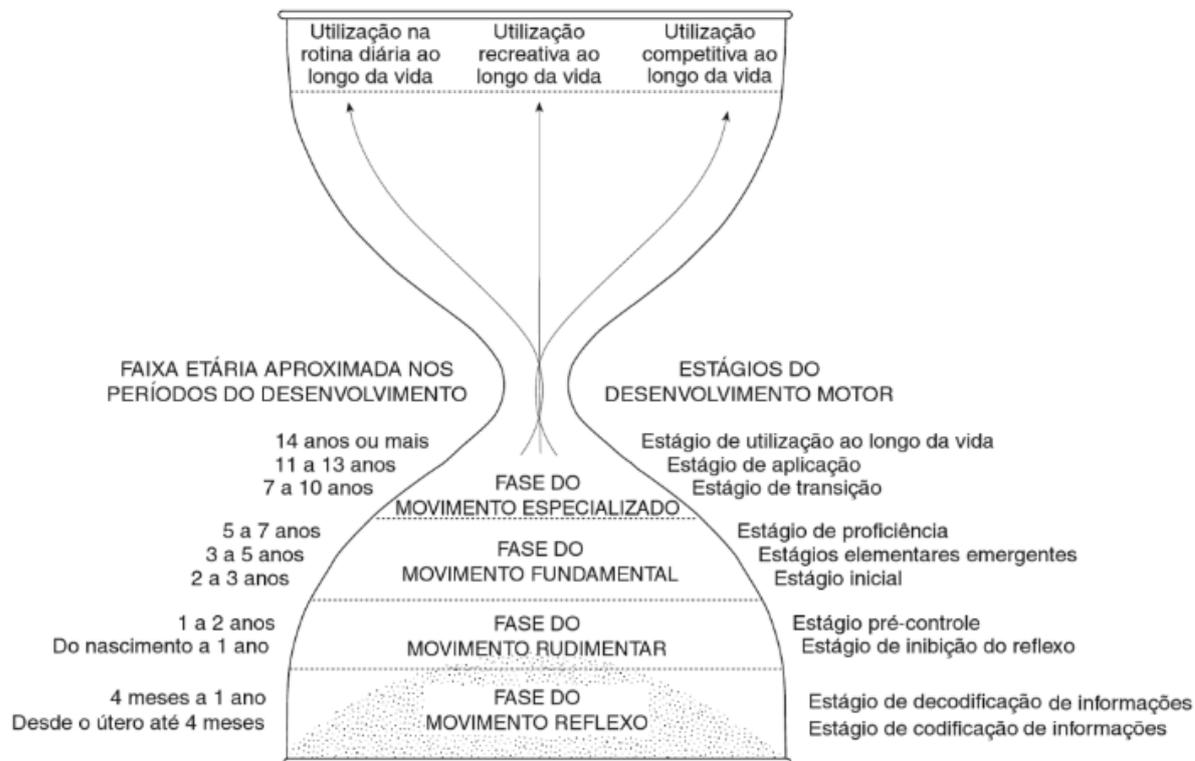


Figura 1. Modelo da ampulheta: fases do desenvolvimento motor em humanos.

Fonte: Gallahue, Ozmun e Goodway (2013).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício físico realizado durante a gestação em intensidade moderada, com e sem sobrecarga, sobre desenvolvimento neuromotor e físico anatômico bem como a homeostase redox e a função mitocondrial da prole de ratas Wistar.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros de reprodução nas ratas sedentárias e exercitadas durante a gestação: taxa de prenhez, ganho de peso durante a gestação, número de filhotes nascidos, proporção entre filhotes machos e fêmeas, peso das ninhadas ao nascer e a viabilidade dos filhotes em PN0 e PN7.

Avaliar os parâmetros de desenvolvimento físico-anatômico da prole de ratas sedentárias e exercitadas no período gestacional: abertura dos olhos, abertura do ouvido externo, dia do aparecimento dos dentes incisivos superiores, cobertura total do corpo por pelos e peso corporal ao nascer (PN0), bem como o ganho de peso até o desmame e o peso na idade adulta (PN60).

Avaliar parâmetros de desenvolvimento neuromotor da prole das ratas sedentárias e exercitadas no período gestacional através dos testes de: endireitamento de superfície, geotaxia negativa, aversão à queda e segurar-se em barra suspensa.

Determinar a função mitocondrial nos músculos sóleo e gastrocnêmio da prole de ratas sedentárias e exercitadas durante o período gestacional via citometria de fluxo.

Determinar parâmetros de homeostase redox nos músculos sóleo e gastrocnêmio da prole de ratas sedentárias e exercitadas durante a gestação, através da avaliação de: níveis de superóxido mitocondrial, oxidação do DCFH, concentração de GSH, atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GLO I, bem como o conteúdo de carbonilas.

3. CAPITULO I

Nesta parte do trabalho serão apresentados os dados que levaram à elaboração de um artigo científico a ser submetido para a revista *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. Especificamente, esse capítulo contém os dados das análises bioquímicas realizadas sobre função mitocondrial e homeostase redox na prole das ratas exercitadas durante a gestação. Demonstramos que o exercício físico em intensidade moderada foi capaz de alterar a função mitocondrial e o estado redox no músculo esquelético da prole de uma maneira sexo dependente na idade adulta. Foi evidenciado também efeitos distintos dependendo do tipo de fibra muscular avaliado entre os sexos. Além disso, em formato de material suplementar, os dados das avaliações dos parâmetros gestacionais das mães e da prole, bem como os dados das análises do desenvolvimento neuromotor e físico anatômico da prole no período neonatal. Assim, demonstramos que o exercício materno durante a gestação não causa nenhum efeito negativo sobre o desenvolvimento pós-natal da prole.

Original Article

Cite this article: Hózer RM, dos Santos BG, August PM, Rodrigues KS, Maurmann RM, Flores EB, and Matté C. 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* doi: 10.1017/S2040174421000209

Received: 25 September 2020
Revised: 19 February 2021
Accepted: 18 March 2021

Keywords:
Maternal exercise; sexual dimorphism; skeletal muscle; mitochondria; redox status; antioxidant

Address for correspondence:
C. Matté, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: matte@ufrgs.br

Maternal exercise during pregnancy modulates mitochondrial function and redox status in a sex-dependent way in adult offspring's skeletal muscle

R.M. Hózer¹, B.G. dos Santos¹, P.M. August¹, K.S. Rodrigues¹, R.M. Maurmann², E.B. Flores² and C. Matté^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil and ³Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Maternal exercise has shown beneficial effects on mother and child. Literature confirm progeny's cognition improvement, and upregulation in neurotrophins, antioxidant network, and DNA repair system. Considering that there is a lack of information demonstrating the impact of maternal exercise on offspring's skeletal muscle, we aimed to investigate the mitochondrial and redox effects elicited by maternal swimming. Adult female Wistar rats were divided into three groups: control sedentary, free swimming, and swimming with overload (2% of the body weight). Exercised groups were submitted weekly to five swimming sessions (30 min/day), starting 1 week prior to the mating and lasting to the delivery. Gastrocnemius and soleus muscle from 60-day-old offspring were analyzed. Our results clearly showed a sex-dependent effect. Male soleus showed increased mitochondrial functionality in the overload group. Female muscle from the overload group adapted deeply. Considering the redox status, the female offspring delivered to overload exercised dams presented reduced oxidants levels and protein damage, allied to downregulated antioxidant defenses. We also observed an increase in the mitochondrial function in the gastrocnemius muscle of the female offspring born from overload exercised dams. Soleus from female delivered to the overload exercise group presented reduced mitochondrial activity, as well as reduced reactive species, protein carbonyls, and antioxidant network, when compared to the male. In conclusion, maternal exercise altered the redox status and mitochondrial function in the offspring's skeletal muscle in a sex-dependent way. The clinical implication was not investigated; however, the sexual dimorphism in response to maternal exercise might impact exercise resilience in adulthood.

Introduction

The prenatal period is one of the most important developmental periods in life, being considered a window of vulnerability.¹ Environmental interventions, such as physical exercise and diets, are able to alter the offspring's susceptibility to the development of diseases later in life.^{1–3} In accordance with the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) concept, the development of several diseases during adulthood is related to the intrauterine environment to which the fetus was exposed, and is directly influenced by the mother's lifestyle, diet, physiological aspects, drugs, and infections.^{3–6}

It is well established that physical exercise during pregnancy is safe for both, mother and fetus.^{7,8} The American College of Sports and Medicine (2017) and the American College of Obstetrics and Gynecologists⁹ (2020) suggest that pregnant women should exercise at least 30 min a day at moderate intensity during pregnancy. Moreover, there is a consistent number of reports demonstrating that maternal exercise during pregnancy is not just safe, but also beneficial to mother and child.^{3,9} Among these beneficial and protective effects, some studies reported increased hippocampal neurogenesis, enhanced memory, and learning capacity, upregulated antioxidant defenses, and mitochondrial biogenesis on the offspring's brain.^{10–12}

Improvement in oxidative capacity allied to mitochondrial biogenesis is a known adaptation of endurance exercise in skeletal muscle.^{13,14} Conversely, several noncommunicable diseases, like obesity, cardiovascular diseases, and diabetes mellitus type 2, present diminished oxidative capacity and mitochondrial dysfunction as a common feature.^{14–17} Since skeletal muscle has an important role in the systemic metabolism homeostasis, it is critical to maintain healthy muscles and to control and prevent metabolic disorders.¹⁸ Amorim, dos Santos¹⁹ show that rats who

exercised at moderate intensity during pregnancy increased the oxygen consumption by skeletal muscle. We sought whether maternal muscle programming could reverberate in the offspring. Skeletal muscles are very plastic tissues; they can adapt depending on the exercise type, intensity, substrate availability, and even under pathological circumstances.^{20,21} However, little is known about the effects of maternal exercise in the offspring skeletal muscle, mainly on what mitochondrial aspects are concerned.

Mitochondria are responsible not only just for the energy supply to the cells, but they are also the main source of reactive oxygen species (ROS).^{22,23} It is well established that exercise increases the production of ROS by mitochondria due to the high ATP demand required for muscle contraction. When the antioxidant network collapses, ROS can cause damage to DNA, lipids, and proteins resulting in oxidative stress.²⁴ However, in the last decade, several studies demonstrated that moderate ROS levels play an important role in cellular signaling pathways, causing beneficial modulations like in inducing the expression of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in several tissues.^{6,12,24–26} Despite such evidence, there are no studies demonstrating that maternal exercise can affect the redox homeostasis in the offspring's skeletal muscle.

The aim of our study is to verify the effects of two different intensity protocols of swimming exercise during pregnancy in the offspring: 2-month-old male and female rats. Our hypothesis is that maternal exercise could improve the offspring's skeletal muscle mitochondrial function and redox status.

Methods

Animals and ethics

Male and female Wistar rats (90 days old) were obtained from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. The animal facility was under controlled light (12:12 h light/dark cycle), temperature (22 ± 1 °C), and humidity conditions (50–60%). Throughout the experiment, all animals had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water *ad libitum*. All experimental procedures and animal care were conducted in accordance with the National Institutes for Health (NIH) guides for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and were approved by the Local Ethics Commission of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS; protocol number 33275). All efforts were made to minimize animal suffering and to keep their number at a minimum to demonstrate consistent effects.

Experimental design and exercise training model

The experimental design of the exercise protocol is demonstrated in Fig. 1. Female rats were divided into three groups: sedentary (control), free swimming exercise, and overload swimming exercise (Fig. 1a). The last group had a 2% (body weight) load addition attached to the tail. The swimming protocol was previously used in our laboratory and was described by Marcelino et al.¹² Female rats from exercised groups swam 1 week prior to mating to habituate to the aquatic environment in a schedule of 5 days/week and 30 min/day. During the mating, two females were housed with one male. The pregnancy was confirmed by the presence of a vaginal plug and the conception day was noted as gestational day (GD) 0.

After the habituation, the free exercised and overload exercised groups swam throughout pregnancy, 5 days/week, lasting 30 min/day in a swimming pool (30 cm wide × 30 cm long × 90 cm deep) filled with 32 ± 1 °C water. The animals were left free to swim, being gently stimulated when not active; except the overload group, which naturally swam all the time. Control sedentary rats were immersed in the water, carefully dried, and returned to the housing boxes. The pregnant rats were weighed daily and the overload was increased in accordance with the rat body weight. This exercise protocol is considered as moderate intensity.

Pregnant females were housed individually on GD20 and allowed normal spontaneous vaginal delivery. We checked for birth twice a day (at 8 a.m. and 6 p.m.) to annotate the postnatal day (PD) 0. The offspring were weaned on PD21 and four rats, of the same gender, were housed per cage, according to the maternal intervention group. On PD60, males and females were euthanized by decapitation after a 4-hour stand fasting. Then, the soleus and lateral gastrocnemius muscles were isolated and used for further biochemical analyses (Fig. 1b).

Sample preparation

Flow cytometry assay

Flow cytometry was previously described in Marcelino et al.¹² Soleus and lateral gastrocnemius muscles were dissociated in PBS containing 1 mg% of collagenase IV (1:10 w/v). Dissociated cells were then filtered using a 40 µm pore size cell strainer (SPL Lifesciences Co., Naechon-Myeon Pocheon, South Korea), and then incubated at 37 °C with specific molecular probes. Cells were gated based on the FSC and SSC pattern of the sample cells and 20,000 events were acquired per sample in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA); a non-labeled sample was used as a negative fluorescent control. Data were analyzed using software FlowJo.

Redox state parameters

Soleus and lateral gastrocnemius muscles were homogenized (1:10 w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was used for the redox state assays.

Biochemical assays

Mitochondrial mass and membrane potential

Mitochondrial mass and membrane potential were assessed by flow cytometry using 100 nM MitoTracker[®] Green and 100 nM MitoTracker[®] Red, respectively, and incubated at 37 °C for 45 min with samples (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).¹²

Mitochondrial superoxide content

Mitochondrial superoxide was measured by flow cytometry using 1 µM MitoSOX[®] Red incubated at 37 °C for 20 min (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).¹²

Determination of total oxidants levels

The total content of oxidants was evaluated by incubating the samples with 240 µl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂D₂CF-DA; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (DCFH-DA) at 37 °C for 30 min in the dark. DCFH-DA is cleaved by cellular esterase and forms DCFH, which is oxidized by the reactive species present in the sample. The reaction can be measured fluorometrically at 488 nm excitation and 525 nm emission wavelength.^{27,28}

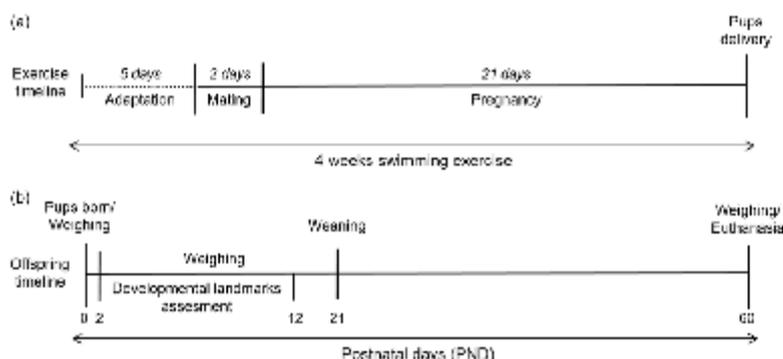


Fig. 1. Experimental designs. (a) Mothers exercise design timeline: the female rats were submitted to swimming exercise during pregnancy 30 min/day, 5 days/week. (b) Offspring experimental design timeline: on PND 60, gastrocnemius and soleus muscles were dissected to further biochemical analyses.

Antioxidant enzymes activity

Superoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated by quantifying the inhibition of the autooxidation of epinephrine by SOD at 480 nm. Considering the protocol used in sample preparation, we measured total SOD activity, expressed as the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to one unit. The results were calculated as units/mg protein.²⁷

Catalase

Catalase (CAT) activity was evaluated by measuring the decrease of hydrogen peroxide at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, and 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 μ mol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity as units/mg protein.²⁹

Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase (GPx) activity was evaluated by the decrease of NADPH concentration at 340 nm. The reaction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.7, containing 1 mM EDTA, 2 mM reduced glutathione, 0.15 U/ml glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.1 mM NADPH, and 0.5 mM tert-Butyl hydroperoxide as enzyme substrate. GPx unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity as units/mg protein.³⁰

Glyoxalase 1

Glyoxalase 1 (GLO1) activity was measured by following the increase in the S-D-lactoylglutathione at 240 nm. The assay takes place in a reaction medium of 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.6, with reduced glutathione 0.01 M and methylglyoxal 0.01 M. GLO1 unit is defined as the amount of enzyme needed to catalyze the formation of 1 μ mol of S-D-lactoylglutathione per minute, and the specific activity is represented as units/mg protein.³¹

Total reduced glutathione content

Initially, the proteins in the supernatant were precipitated with meta-phosphoric acid (1:1, v/v), and centrifuged at 5000 g for 10 min at 25 °C. Reduced glutathione (GSH) present in the supernatant reacts with the fluorophore o-phthalaldehyde 7.5 mM prepared in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, with 5 mM EDTA. The fluorescence was read at excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively, using the SpectraMax Gemini XS Fluorescence microplate reader (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, USA). A standard GSH curve ranging from 0.001 to 1 mM was prepared and a blank sample was performed in parallel. Data were expressed as nmol of GSH/mg protein.³²

Protein carbonyl content

Carbonyl content was assessed according to Reznick and Packer.³³ Protein carbonyls react with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that was detected at 370 nm. For carbonyl determination, we first measured the protein content of the samples and used an interval of 0.7–1 mg of protein for carbonyl assay. Then, an equal volume of 20% TCA was added to the microtubes following 5 min incubation at 4 °C. After the 5-minute incubation, the samples were centrifuged at 4000 g for 5 min at 4 °C. Then, the supernatant was discarded and suspended with 100 μ l of 0.2 M NaOH. Following, 100 μ l of 2 M HCl was added to the control samples and 100 μ l of 100 mM DNPH was added to the test samples, and both were incubated at room temperature for 1 h and shaken every 15 min during this period. Following the 1 h incubation, 100 μ l of 20% TCA was added to the samples, and again incubated at 4 °C for 5 min and then centrifuged at 20,000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was further washed three times with 500 μ l of ethyl acetate:ethanol (1:1, v/v) and centrifuged again at 20,000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellets were resuspended in 8 M urea pH 2.3. The samples were incubated at 60 °C for 15 min and then centrifuged at 20,000 g for 3 min and the absorbance was measured at 370 nm. Protein carbonyl content was expressed as nmol/mg protein.

Total protein concentration

Protein concentration was measured according to Lowry et al.³⁴

Statistical analysis

All data were tested for normality and analyzed by two-way ANOVA to evaluate the effect of two different independent variables, maternal exercise and offspring sex, followed by Tukey's *post hoc* test. GraphPad Prism 6.0 software was used to perform all statistical analyses. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Maternal exercise increases offspring functional mitochondria in a sex-dependent way on different muscular fiber types

The number of functional mitochondria was accessed using Mitotracker Green and Mitotracker Red double-labeled events

Fig. 2. Biochemical analysis. Percentage of double-positive MitoTracker Green and MitoTracker Red-labeled cells. (a) Gastrocnemius muscle. (b) Soleus muscle. Data were evaluated by two-way ANOVA and Tukey's test was used to compare groups and sex. * $p < 0.05$. Data were presented as mean \pm SEM (7–12 animals per group, from distinct breeds).

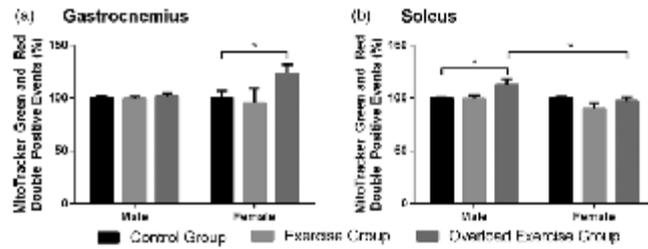
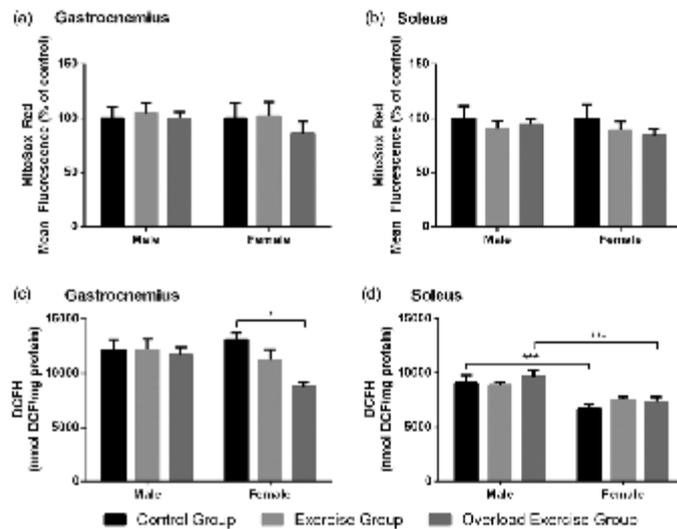


Fig. 3. Biochemical analysis. Mitochondrial superoxide levels by MitoSox Red fluorescence was evaluated in (a) Gastrocnemius muscle and (b) Soleus muscle. DCFH oxidation was evaluated in (c) Gastrocnemius muscle and (d) Soleus muscle. Data were evaluated by two-way ANOVA and Tukey's test was used to compare groups and sex. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Data were presented as mean \pm SEM (7–12 animals per group, from distinct breeds).



via flow cytometry. Double-labeled events indicate functional respiring mitochondria,³⁵ in this case, showing an increased number of functional mitochondria in the offspring skeletal muscle.

An increase in the mitochondrial mass and membrane potential was observed in the female gastrocnemius muscle from the overload exercised group when compared to the control females ($p < 0.05$). No alteration was identified in the males (Fig. 2a). On the other hand, the mitochondrial mass and membrane potential on soleus muscle were increased on male pups from the overload exercised group when compared with both the male control group ($p < 0.05$) and the female from overload exercised group ($p < 0.05$) (Fig. 2b).

Maternal exercise affects the redox status on lateral gastrocnemius muscle in offspring in a sex-dependent way

Despite no alteration in mitochondrial superoxide levels were observed on lateral gastrocnemius ($p > 0.05$) (Fig. 3a), we did observe a reduction in DCFH oxidation on female pups from the overload exercised group when compared to the female control group ($p < 0.05$) (Fig. 3c).

Considering the antioxidant enzymes, we observed a decreased activity of SOD (Fig. 4a) and GPx (Fig. 4c) in the female pups born from overload exercised dams versus males from the same group

($p < 0.01$). No alteration was observed on CAT activity ($p > 0.05$) (Fig. 4b). We also observed the inhibition of GLO1 activity in the female pups from the overload exercised group when compared to the female control group ($p < 0.05$), while no alterations were seen on male pups (Fig. 4d). GSH, the substrate for GPx and GLO1, was decreased in female pups from both exercised groups (regular and overload) when compared with the female control group ($p < 0.05$). Besides that, we observed a decreased GSH content in the female pups from the overload exercised group when compared with the male pups from the same group ($p < 0.05$) (Fig. 4e).

Carbonyl concentration, a marker for protein damage, was decreased in the female pups from the overload exercised group when compared to the control females ($p < 0.05$), while no alteration was identified on male pups (Fig. 6a).

Maternal exercise alters total oxidant production and redox status in a sex-dependent way on soleus muscle

Although no alteration on mitochondrial superoxide levels was observed on soleus muscle ($p > 0.05$) (Fig. 3b), DCFH oxidation was reduced in the female pups born from control and overload exercised groups when compared with the male pups in the same groups ($p < 0.001$) (Fig. 3d).

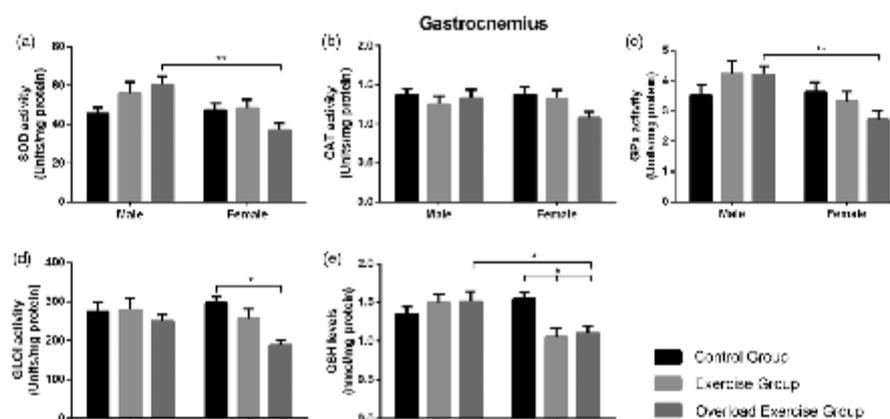


Fig. 4. Lateral gastrocnemius muscle antioxidant status analysis. Biochemical assays: (a) SOD activity, (b) CAT activity, (c) GPx activity, (d) GLO1 activity, and (e) GSH content. Data were evaluated by two-way ANOVA and Tukey's test was used to compare groups and sex. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Data were presented as mean \pm SEM (9–12 animals per group, from distinct breeds).

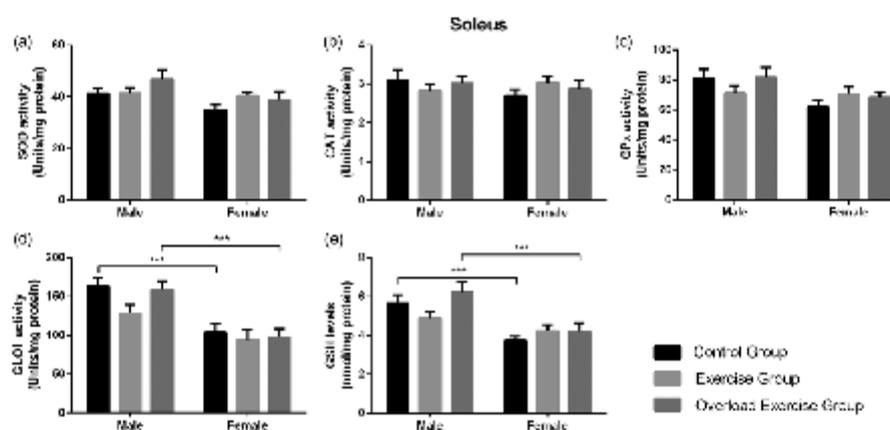


Fig. 5. Soleus muscle antioxidant status analysis. Biochemical assays: (a) SOD activity, (b) CAT activity, (c) GPx activity, (d) GLO1 activity, and (e) GSH content. Data were evaluated by two-way ANOVA and Tukey's test was used to compare groups and sex. *** $p < 0.001$. Data were presented as mean \pm SEM (9–12 animals per group, from distinct breeds).

We also evaluated the main antioxidant enzymes, and no alteration was observed on SOD, CAT, and GPx activities ($p > 0.05$; Fig. 5a–c, respectively). On the other hand, reduced GLO1 activity was observed both in control and overload exercised female pups when compared to the males from the same groups ($p < 0.001$) (Fig. 5d). In addition, GSH content from the control female and overload exercised pups was reduced in comparison to males in the same groups ($p < 0.001$), while no alterations were observed between other groups (Fig. 5e). Finally, we observed a reduced carbonyl content in the female pups from the overload exercised group when compared with the male pups from the same group ($p < 0.001$) (Fig. 6b).

Discussion

In this study, we aimed to demonstrate the impact of two different maternal exercise intensities, performed during pregnancy, in the skeletal muscle of male and female offspring. To our knowledge, it is the first study to assess the redox status in the offspring skeletal muscle. We demonstrated that moderate-intensity swimming exercise (with overload) during pregnancy can affect the skeletal muscle mitochondria and redox status both in male and female offspring differently at PND 60. Females are more affected, presenting reduced ROS, antioxidant activity, and protein damage in gastrocnemius muscle, while female soleus muscle presents

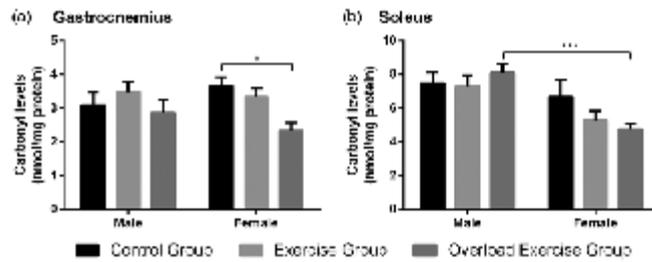


Fig. 6. Biochemical assay. Carbonyl levels (a) Gastrocnemius muscle, (b) Soleus muscle. Data were evaluated by two-way ANOVA and Tukey's test was used to compare groups and sex. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Data were presented as mean \pm SEM (7–12 animals per group, from distinct breeds).

similar metabolic adaptation as gastrocnemius when compared to the male overload group, but not with female control. Regarding the mitochondrial function and content, we observed an increased mitochondrial mass and membrane potential in the females' gastrocnemius muscle, which is in accord with reduced ROS in this muscle. Interestingly, we observed an increased mitochondrial mass and membrane potential in the males' soleus muscles. This was the only adaptive effect observed in males' muscle, suggesting that the sex-dependent effect is powerful.

We have used soleus and lateral gastrocnemius muscles in order to obtain most specifically type I and II muscle fibers, known by their distinct metabolic characteristics as oxidative and glycolytic metabolism, respectively, aiming to demonstrate the effects of maternal exercise in both male and female offspring skeletal muscle.^{20,36–38} In this case, we demonstrated that maternal exercise affected mitochondria mainly in type II on female offspring while on male offspring it affected type I fibers. In a study, Liu et al.³⁹ demonstrated that pups born to exercised dams have increased expression of myosin heavy chain I (MHC I) in plantaris muscle and increased expression in troponin T and I, on lateral gastrocnemius muscle. This can partly explain the differences found in the offspring skeletal muscle, demonstrating that maternal exercise can alter the expression of muscular proteins and in consequence, its metabolism, since type I fiber possess increased oxidative capacity due to the greater mitochondrial content.^{20,26}

In previous works, our research group already demonstrated that maternal exercise can improve antioxidant defenses and increase the number of functional mitochondria, revealed by increased α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) and complex IV activities, as well as immunoccontent of protein mitofusin-1 (Mfn-1), early and late in life on the brain of pups born to exercised dams.^{12,40} Human and rodent studies have already demonstrated that Mfn-1/2, proteins related to mitochondrial fusion, are increased in the skeletal muscle as a response to physical exercise,^{41–43} which can be related to our result on increased mitochondrial content found in female gastrocnemius and male soleus. In addition, Liu et al.³⁹ reported that maternal exercise increased mitochondrial volume density and length and increased citrate synthase activity in plantaris muscle. In the quadriceps femoris muscle, the pups also presented increased cytochrome c oxidase activity and cellular energy levels. Furthermore, their study also demonstrated increased immunoccontent of mitochondrial fission protein 1 (FIS1), Lon protease (LON), and the mitochondrial transcription factor A (TFAM), which is responsible for the mitochondrial DNA replication, leading to mitochondrial biogenesis in response to exercise.^{44,45} In accord, Siti, Dubouchaud⁹ demonstrated that pups born from exercised mother during pregnancy present increased complex IV activity and reduced hydrogen

peroxide (H_2O_2) release by the mitochondria in offspring skeletal muscle, in accord with our data.

The majority of the medical and exercise studies are conducted only in males.⁴⁶ Notwithstanding, some studies already demonstrated sexual dimorphic adaptations in the skeletal muscle of male and female rats. Farhat and colleagues⁴⁷ showed that aerobic exercise increased the mitochondrial function on gastrocnemius muscle in both male and female exercised rats; however, the effects are more pronounced in male than female rats. Other studies also show that females possess a greater proportion of type I muscle fiber, increased intramuscular lipid storage, and lipid oxidation in the skeletal muscles than males.^{13,48} In the same way, females appear to consume less carbohydrate and protein as substrates during endurance exercise than males,^{13,44,49} which demonstrate greater oxidative capacity, which is mainly characteristic of type I fibers. With this in mind, it is possible to infer that the female offspring born from exercised dams show increased proportion of type I fibers or metabolic properties changes in the lateral gastrocnemius compared to the males since gastrocnemius is a more heterogeneous muscle than soleus in the proportion of fiber type's proportion and metabolic properties.³⁷

Related to the redox status, we previously showed that maternal interventions during pregnancy increased the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in the pups' brain.^{6,12} In the present study, the most intense alteration in redox status was observed in the female lateral gastrocnemius muscle. We found reduced levels of ROS allied to reduced antioxidant enzyme activity. The inhibition of GPx and GLO1 is probably related to diminished GSH levels. Reduced antioxidant status can have several detrimental effects on health, which can lead to a pro-oxidant environment and cause damage to proteins, lipids, and DNA, inducing oxidative stress and cell death.^{24,50} Oxidative stress is a known feature of several noncommunicable diseases such as diabetes mellitus type 2, obesity and even limiting exercise capacity due to mitochondrial dysfunction.⁵⁰ However, despite the reduction in the antioxidant network found in our study, the ROS and carbonyl content, an index of protein damage, were reduced in the female pups born to overload exercised dams. These findings correlate to each other and are in accord with the increased functionality of mitochondria, preventing the leak of electrons from the respiratory chain and ROS production. Interestingly, the redox adaptation found in soleus from female offspring is similar to that found in gastrocnemius, when compared to male offspring.

Mitochondria seem to be the center of all alterations that we observed since it is the largest producer of ROS in cells.^{22,23} Moreover, studies already reported that the most relevant differences in the antioxidant defenses between males and females are found in mitochondria.^{22,51,52} It has been reported that females produce less H_2O_2 than males, and, consequently, are less prone to

oxidative damage.^{53,54} This data are in accord with what we observed in oxidant levels and carbonyl content from overloaded exercised females in our study. Farhat et al.⁴⁷ also demonstrated that trained female rats are more resistant to mitochondrial function reduction when exposed to ROS than males and, in the same study, the females showed less antioxidant defenses and reduced malondialdehyde (MDA) content in the gastrocnemius muscle than males, similar to our findings to both muscles.

The sex-dependent alteration found in our study is abysmal, and probably has participation in, but is not limited to, the sexual hormones. Despite that estrogen hormone is found in males, it is mainly a female sex hormone.⁵⁵ The protective effects of estrogen are well reviewed by Enns and Tidus,⁵⁵ reporting its antioxidant effect, membrane stabilizer, as well as regulating the expression of several genes. Moreover, studies also demonstrated that exercise increases the expression of estrogen receptors alpha (ERα) that are found in skeletal muscle, including in mitochondria, which is associated with the increase in mitochondrial function.^{22,56,57} In this way, estrogen may be potentially acting in cell signaling and stimulating the expression of Mn-SOD, or simply acting as an oxidant scavenger, due to its structural similarity to other antioxidants like vitamin E,⁵⁵ which can explain the reduced oxidant content and also the antioxidant network, found in the females in our model. Unfortunately, we did not evaluate the estrous cycle on females and the hormonal profile of the groups to answer this specific hypothesis in our study.

Finally, in order to check if the maternal exercise during pregnancy could cause any harm to mother or fetus, we evaluated several gestational parameters on the dams and litter, as well as postnatal neuromotor and anatomical developmental parameters on the postnatal period on the offspring, which are disposed in the Supplementary material. In this way, we observed a decrease in the pregnancy rate on the overload exercised dams. We believe that it was the first mention in literature for this effect, and has to be confirmed in future studies. We did not observe any other negative effects in the evaluated parameters on the dams or offspring, which presented normal weight at birth and normal neuromotor and anatomical development in the neonatal period, demonstrating that overload exercise does not cause any harmful effects on the pups' postnatal development.

Conclusion

Taken together, our results add important evidence to the DOHAD literature, demonstrating sex-specific adaptations found in offspring born from exercised mothers. We demonstrated that both males and females showed increased functional mitochondria in the skeletal muscle as an adaptation to dams moderate exercise. The exercise affected pups' skeletal muscle fiber, types I and II, in a sex-dependent way, concerning to redox status, where female pups show less oxidants production, reduced antioxidant defenses, and diminished protein damage. Gastrocnemius was more deeply affected than soleus. In conclusion, we demonstrate that the maternal exercise during pregnancy can affect male and female pups' skeletal muscle and that sex is a very important factor that must be taken into account for future investigations.

Acknowledgments. Our most sincere thanks to all colleagues from Matte laboratory and the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório and Central Animal House of Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil for the animal care.

Financial support. This study was funded by CNPq, FAPERGS, and PROPSQ-UFRGS.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethical standards. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (National Institutes for Health (NIH) Guides for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and has been approved by the Local Ethics Commission of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS; protocol number 33,275).

Supplementary material. To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S2040174421000209>.

References

- Bale TL, Baram TZ, Brown AS, et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry*. 2010; 68(4): 314–319.
- Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res*. 2004; 56(3): 311–317.
- Moyer C, Reoyo OR, May L. The influence of prenatal exercise on offspring health: a review. *Clin Med Insights Womens Health*. 2016; 9: 37–42.
- Eclaral JD, Zhu S, Baker MS, et al. Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. *FASEB J*. 2016; 30(7): 2541–2548.
- McCloskey K, Ponsonby AL, Collier F, et al. The association between higher maternal pre-pregnancy body mass index and increased birth weight, adiposity and inflammation in the newborn. *Pediatr Obes*. 2018; 13(1): 46–53.
- Stone V, Crestani MS, Saccomori AB, et al. Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. *J Nutr Biochem*. 2019; 67: 138–148.
- Dipietro L, Evenson KR, Bloodgood B, et al. Benefits of physical activity during pregnancy and postpartum: an umbrella review. *Med Sci Sports Exerc*. 2019; 51(6): 1292–1302.
- Physical activity and exercise during pregnancy and the postpartum period: ACOG Committee Opinion, Number 804. *Obstet Gynecol*. 2020; 135(4): e178–e188.
- Sti F, Dubouchaud H, Hininger I, et al. Maternal exercise before and during gestation modifies liver and muscle mitochondria in rat offspring. *J Exp Biol*. 2019; 222(10): jeb194969.
- Lee HH, Kim H, Lee JW, et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev*. 2006; 28(3): 147–154.
- Akhavan MM, Emami-Abarghoie M, Safari M, et al. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. *Neuroscience*. 2008; 153(4): 1173–1183.
- Maxelino TB, Longoni A, Kudo KY, et al. Evidence that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*. 2013; 246: 28–39.
- Landen S, Voisin S, Craig JM, McGee SL, Lamon S, Eynon N. Genetic and epigenetic sex-specific adaptations to endurance exercise. *Epigenetics*. 2019; 14(6): 523–535.
- Laakonen DE, Lakka HM, Salonen JT, Niskanen LK, Rauramaa R, Lakka TA. Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2002; 25(9): 1612–1618.
- Myers J, Kaykha A, George S, et al. Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. *Am J Med*. 2004; 117(12): 912–918.
- Camps J, Garcia-Heredia A, Hernandez-Aguilera A, Joven J. Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable diseases. *Chem Biol Interact*. 2016; 259(Pt B): 382–387.
- Hernández-Aguilera A, Rull A, Rodríguez-Gallego E, et al. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 135698.

18. Milkovic J, Lamon S. The effect of maternal metabolic status on offspring health: a role for skeletal muscle? *J Physiol* 2018; 596(21), 5079–5080.
19. Amorim MF, dos Santos JA, Hirabara SM, et al. Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? *Exp Physiol* 2009; 94(8), 906–913.
20. Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol* 2004; 2(10), e148.
21. Pattanakuhar S, Pongchaldech A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application. *Obes Res Clin Pract* 2017; 11(5 Suppl 1), 112–132.
22. Ventura-Clapier R, Piquereau J, Vekaler V, Garnier A. Estrogens, estrogen receptors effects on cardiac and skeletal muscle mitochondria. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10, 557.
23. Bollstey S, James EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2013; 14(3), 6306–6344.
24. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000; 50(4–5), 271–277.
25. Rech A, Radaelli R, De Asais AM, et al. The effects of strength, aerobic, and concurrent exercise on skeletal muscle damage in rats. *Muscle Nerve* 2014; 50(1), 79–86.
26. Vina J, Sanchez-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug: the pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol* 2012; 167(1), 1–12.
27. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10), 3170–3175.
28. LeBel CP, Ichiroopoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5(2), 227–231.
29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105, 121–126.
30. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77, 325–333.
31. Thornalley PJ, Tisdale MJ. Inhibition of proliferation of human promyelocytic leukaemia HL60 cells by S-D-lactoylglutathione in vitro. *Leukemia Res* 1988; 12(11–12), 897–904.
32. Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 1998; 108, 347–352.
33. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233, 357–363.
34. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1), 265–275.
35. Tai MC, Sasaki M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(8), 2770–2775.
36. Bloembergen D, Quadrilatero J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One* 2012; 7(4), e35273.
37. Cornachione AS, Benedini-Elias PC, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochem Cytochem* 2011; 44(2), 43–50.
38. Ustund I, Demir R. A histochemical, morphometric and ultrastructural study of gastrocnemius and soleus muscle fiber type composition in male and female rats. *Acta Anat (Basel)* 1997; 158(4), 279–286.
39. Liu J, Lee I, Feng HZ, et al. Aerobic exercise pre-conception and during pregnancy enhances oxidative capacity in the hindlimb muscles of mice offspring. *J Strength Cond Res* 2018; 32(5), 1391–1403.
40. Klein CP, Hoppe JB, Saccomori AB, et al. Physical exercise during pregnancy prevents cognitive impairment induced by amyloid-beta in adult offspring rats. *Mol Neurobiol* 2019; 56(3), 2022–2038.
41. Bell MB, Bush Z, McGinnis GR, Rowe GC. Adult skeletal muscle deletion of Mitofusin 1 and 2 impedes exercise performance and training capacity. *J Appl Physiol (1985)* 2019; 126(2), 341–353.
42. Cartoni R, Leger B, Hock MB, et al. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 2005; 567(Pt 1), 349–358.
43. Zorano A. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009; 34(3), 433–439.
44. Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The role of exercise and TFAM in preventing skeletal muscle atrophy. *J Cell Physiol* 2017; 232(9), 2348–2358.
45. Jomayaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 2010; 47, 69–84.
46. Costello JT, Biezen F, Beakley CM. Where are all the female participants in sports and exercise medicine research? *Eur J Sport Sci* 2014; 14(8), 847–851.
47. Farhat F, Amérand A, Simon B, Guegueniat N, Moisan C. Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. *Redox Rep* 2017; 22(6), 508–514.
48. Montero D, Madsen K, Meinild-Lundby AK, Edin F, Lundby C. Sexual dimorphism of substrate utilization: differences in skeletal muscle mitochondrial volume density and function. *Exp Physiol* 2018; 103(6), 851–859.
49. Turnopolsky MA. Sex differences in exercise metabolism and the role of 17-beta estradiol. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40(4), 648–654.
50. Malomi W, Campos I, Straface E, Vella S, Franconi F. Redox features of the cell: a gender perspective. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(11), 1779–1801.
51. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, et al. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131(9), 808–822.
52. Vina J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett* 2005; 579(12), 2541–2545.
53. Mallay S, Gill R, Young A, Mailloux RJ. Sex-dependent differences in the bioenergetics of liver and muscle mitochondria from mice containing a deletion for *Antioxidants (Basel)* 2019; 8(8), 245.
54. Enns DL, Tildus PM. The influence of estrogen on skeletal muscle sex matters. *Sports Med* 2010; 40(1), 41–58.
55. Lemoine S, Granier P, Tiffiche C, et al. Effect of endurance training on estrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2002; 174(3), 283–289.
56. Hamilton DJ, Minze LJ, Kumar T, et al. Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. *Physiol Rep* 2016; 4(17), e12913.
57. Calvino-Núñez C, Domínguez-del-Toro E. Clonidine treatment delays postnatal motor development and blocks short-term memory in young mice. *PLoS One* 2014; 9(12), e114869.
58. Heyser CJ. Assessment of developmental milestones in rodents. *Curr Protocols Neurosci* 2004; Chapter 8: Unit 8.18.
59. Chen C, Tang Y, Jiang X, et al. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Toxicol Sci* 2012; 125(1), 248–261.
60. Yamashiro KI, Wabayama T, Blanchard RJ, Blanchard DC, Yanagimachi R. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod* 2000; 63(1), 328–334.

4. DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos da prática regular de exercícios físicos são amplamente demonstrados em diversas populações, inclusive em gestantes. Há um crescente número de evidências demonstrando os efeitos benéficos da prática de exercícios maternos durante a gestação sobre a saúde dos filhos. Dessa forma, o objetivo de nosso estudo foi demonstrar os efeitos de dois modelos de exercício de natação, com e sem sobrecarga, na musculatura esquelética da prole de ratas exercitadas durante a gestação.

A fim de avaliarmos possíveis efeitos adversos dos protocolos de natação nas ratas prenhas e sua prole, avaliamos diversos parâmetros gestacionais nas mesmas, além de realizarmos uma bateria de testes que avaliam o desenvolvimento neuromotor e anatômico da prole no período neonatal. Dessa forma, foi constatado uma diminuição na taxa de prenhez das ratas exercitadas com sobrecarga (2% do peso corporal), o que de alguma forma poderia refletir em efeitos adversos sobre outros parâmetros analisados nas mães ou na prole. Contudo, apesar de verificarmos uma diminuição na taxa de prenhez do grupo exercitado com sobrecarga, não observamos outras alterações negativas nas avaliações de desenvolvimento realizadas nas mães, ou nos filhotes desse grupo. Ainda, esses dados demonstram que o protocolo de natação com sobrecarga aplicado não afeta negativamente o desenvolvimento intrauterino da prole, evidenciado pelo seu peso ao nascer, bem como seu ganho de peso ao longo dos dias e seu desempenho na bateria de testes e observações realizados, que não difere entre grupos.

No que tange especificamente ao desenvolvimento das características físico-anatômicas da prole, não observamos diferença significativa entre os grupos exercitados e sedentário, ou entre o sexo dos animais. Em outras palavras, mesmo

o exercício físico materno com sobrecarga realizado durante a gestação não acelera ou causa atrasos no desenvolvimento anatômico da prole, evidenciados pelo peso dos animais ao longo dos dias e pelas observações realizadas na prole.

A prole de ratos, assim como a de humanos é altricial³ ao nascer, logo, não existirem atrasos no desenvolvimento físico (anatômico e neuromotor) é um fator imprescindível para a sobrevivência e independência do neonato em fases posteriores da vida, tendo em vista que um atraso no período neonatal pode significar um atraso em todas as fases de desenvolvimento posteriores. Por este ângulo, embora não tenhamos observado melhoras no desenvolvimento da prole das ratas exercitadas, vale a ressalva de que não foram observados atrasos no desenvolvimento em nenhum dos parâmetros avaliados, em ambas as proles dos grupos exercitados.

Dado o fato de que o desenvolvimento neuromotor está intimamente relacionado com o desenvolvimento cerebral, buscamos avaliar o desenvolvimento neuromotor na prole de ratas exercitadas em duas intensidades de exercício distintas. O encéfalo de um rato entre sete e dez dias de vida possui desenvolvimento equivalente ao encéfalo de uma criança nascida a termo (SEMPLE *et al.*, 2013). Dessa forma, se torna interessante avaliar os efeitos do exercício materno sobre o desenvolvimento neuromotor da prole no período neonatal, já que uma parte considerável do desenvolvimento cerebral do rato acontece nesse período, o que acaba por facilitar a identificação de possíveis atrasos no desenvolvimento, tornando-se uma ferramenta útil para avaliar diferentes intervenções gestacionais e seus impactos.

³Altricial são animais diretamente dependentes dos progenitores para sua termorregulação, alimentação e locomoção em sua fase mais tenra do desenvolvimento.

Em concordância com o desenvolvimento das características anatômicas, também não observamos diferenças no desempenho das proles nos testes de avaliação do desenvolvimento neuromotor. Todavia, como esperado, o tempo de resposta dos animais nos testes realizados foi melhorando com o passar dos dias, sem diferenças entre grupos e sexo. Em outras palavras, todos os grupos avaliados tiveram melhora semelhante no tempo de resposta nos testes, o que indica que o exercício físico de intensidade leve a moderada não afeta o desenvolvimento motor da prole, tanto positivamente como negativamente. Esses resultados se sustentam e corroboram com os resultados das avaliações do peso corporal dos animais que, como citado anteriormente, não diferem quanto a seu peso ao nascer ou quanto ao ganho de peso ao longo dos dias até o desmame.

Em consonância com nosso trabalho, os resultados obtidos no estudo de Falcão-Tebas *et al.* (2012) também não demonstra diferença no desenvolvimento físico na prole de ratas controle e exercitadas durante a gestação. Juntos, nossos achados evidenciam que o exercício físico materno durante a gestação não causa efeitos adversos ou acelera o desenvolvimento físico da prole, tanto em machos como em fêmeas. Entretanto, o estudo de Falcão-Tebas *et al.* (2012) evidencia também um efeito protetor do exercício materno, demonstrando prevenir atrasos no desenvolvimento da prole, comumente ocasionados por hábitos de vida inadequados e conhecidos por atrasar o desenvolvimento da prole, como hábitos alimentares inapropriados, muito presentes em nossa sociedade.

Como a obtenção de nutrientes e oxigênio do feto durante a gestação se dá via placenta, o peso da prole no momento do nascimento traz uma boa representação acerca do desenvolvimento da fase intrauterina (CLAPP *et al.*, 2000). Além disso, a literatura demonstra que a intensidade, o volume e o tipo de exercício

realizado durante a gestação são capazes de alterar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio para o feto, o que pode acarretar em alterações no peso e no desenvolvimento da prole (CLAPP, 2003. CLAPP, 2006; CLAPP *et al.*, 2002).

O exercício físico tem a capacidade de causar redistribuição do fluxo sanguíneo para a musculatura, sendo esse um efeito intensidade, modalidade e volume dependente, o que poderia causar uma redistribuição do fluxo sanguíneo da placenta para os músculos da gestante no momento do exercício, reduzindo o aporte de nutrientes e oxigênio para o feto. Contudo, a literatura não apresenta consenso sobre o exercício aeróbico em intensidades moderadas alterarem o fluxo sanguíneo da placenta (DE OLIVERIA MELO *et al.*, 2012; LASHLEY *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016). Nessa mesma linha, a literatura discute que, caso aconteça, pequenos períodos de alteração do fluxo sanguíneo não trazem efeitos adversos para a prole (DE OLIVERIA MELO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, é sabido que o crescimento do feto depende da taxa de entrega constante de nutrientes e oxigênio ao longo das 24 horas diárias, o que implica que curtos períodos de redirecionamento do fluxo sanguíneo podem não ser nocivos e podem causar adaptações benéficas no feto. A literatura demonstra algumas evidências acerca dessa ideia, demonstrando que o exercício durante a gestação melhora o volume placentário, sanguíneo e o débito cardíaco das gestantes, o que pode aumentar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio para o feto, melhorando seu desenvolvimento intrauterino (CLAPP, 2003; CLAPP, 2006). Por fim, embora o exercício físico durante a gestação não tenha acelerado o desenvolvimento físico da prole, o mesmo não causou efeitos negativos. E, em adição, há um número considerável de evidências relatando seu efeito protetor em relação à prole, com modulações benéficas pronunciadas até mesmo na idade adulta, o que reforça a

importância de gestantes se engajarem em atividades físicas durante a gravidez como forma de obter benefícios a si próprias e também ao bebê.

Nesse trabalho, também, demonstramos que o exercício de natação, em intensidade moderada, realizado pela mãe durante a gestação afeta a capacidade mitocondrial e o estado redox de forma diferente em machos e fêmeas na idade adulta. Em relação ao conteúdo e função mitocondrial, observamos um aumento da massa e potencial de membrana mitocondrial no músculo gastrocnêmio lateral das fêmeas, mas não nos machos, prole do grupo exercitado com sobrecarga. Interessantemente, de forma inversa, no músculo sóleo, observamos um aumento da massa e potencial de membrana mitocondrial dos machos, mas não das fêmeas, ambos prole das mães exercitadas com sobrecarga.

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, alterando sua morfologia em resposta a diferentes circunstâncias. Portanto, o balanço entre a fusão e fissão mitocondrial tem sido colocado como um dos eventos responsáveis por auxiliar o aumento da massa mitocondrial e da capacidade oxidativa muscular (BELL *et al.*, 2019; CARTONI *et al.*, 2005). Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o exercício materno durante a gestação aumenta o número de mitocôndrias funcionais da prole, tanto no período neonatal quanto na vida adulta (KLEIN *et al.*, 2019; MARCELINO *et al.*, 2013). Esses estudos também demonstraram aumento na atividade da enzima α -cetoglutarato-desidrogenase bem como do complexo IV do STEM. Além disso, também evidenciaram aumento nas defesas antioxidantes, aumento no imunocônteúdo de mitofusina 1 (Mfn-1) no cérebro da prole de mães exercitadas durante a gestação. É importante ressaltar que os estudos prévios de nosso laboratório foram realizados em filhotes machos, utilizando o encéfalo como tecido alvo. Contudo, apesar de não ser o mesmo tecido

utilizado nesse trabalho, o aumento no conteúdo de Mfn-1 relatado em nossos estudos prévios pode estar relacionado com o aumento do número de mitocôndrias funcionais encontrado no músculo da prole das ratas exercitadas. Além de tudo, estudos em humanos e roedores já demonstraram que as proteínas Mfn-1/2, ambas as proteínas relacionadas à fusão mitocondrial estão aumentadas no músculo em resposta ao exercício físico (BELL *et al.*, 2019; CARTONI *et al.*, 2005; ZORZANO, 2009).

Apesar de poucos estudos demonstrarem os efeitos do exercício materno durante a gestação na musculatura da prole, os trabalhos conduzidos por LIU *et al.* (2018) e SITI *et al.* (2019) introduzem evidências sólidas sobre a capacidade do exercício materno em aumentar a densidade e a capacidade oxidativa mitocondrial no músculo da prole. Liu *et al.* (2018) demonstraram que a prole de ratas exercitadas durante a gestação teve um aumento na densidade e no comprimento mitocondrial no músculo. Além disso, também demonstraram aumento na atividade da citrato-sintase e do complexo IV, bem como maiores níveis de ATP nesse tecido na prole. Em adição, também foi demonstrado maior imunocônteúdo das proteínas de fissão mitocondrial 1 (FIS1), Lon protease (LON) e também do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), responsável pela replicação do DNA mitocondrial, levando à biogênese mitocondrial (JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010; THEILEN, KUNKEL e TYAGI, 2017). Ainda, o estudo conduzido por Siti *et al.* (2019) apresenta mais evidências sobre o aumento da função mitocondrial, demonstrando que a prole das ratas exercitadas durante a gestação apresenta maior atividade do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons e menor produção de H₂O₂ mitocondrial. Nesse sentido, ambos os estudos corroboram com nossos achados em

relação ao aumento do conteúdo e função mitocondrial encontrado na prole das ratas exercitadas.

Utilizamos os músculos sóleo e gastrocnêmio lateral a fim de obtermos músculos com maior especificidade de fibras do tipo I e II, conhecidos por suas características predominantemente oxidativas e glicolíticas, respectivamente (BLOEMBERG e QUADRILATERO, 2012; CORNACHIONE *et al.*, 2011; USTUNEL e DEMIR, 1997; ZIERATH e HAWLEY, 2004). Contudo, um dos objetivos de nosso estudo foi demonstrar os efeitos do exercício materno durante a gestação sobre diferentes tipos de fibras musculares na prole de ambos os sexos. Assim, demonstramos que o exercício materno aumentou a função mitocondrial somente nas fibras do tipo II nas fêmeas e nas fibras do tipo I nos machos. Nesse sentido, Liu *et al.* (2018) demonstraram que a prole de ratas exercitadas durante a gestação possui maior expressão de cadeias pesadas de miosina do tipo I (MHCI), além de maior expressão das isoformas de contração lenta da troponina T e I no músculo gastrocnêmio lateral. Em outras palavras, o exercício aeróbico da mãe é capaz de alterar a expressão das proteínas musculares na prole, fazendo com que haja uma mudança na predominância de fibras do tipo II para as de tipo I. Esses achados podem parcialmente explicar as diferenças encontradas em nosso trabalho, já que as fibras do tipo I apresentam maior capacidade oxidativa devido ao maior conteúdo mitocondrial em comparação ao tipo II (VINA *et al.*, 2012; ZIERATH e HAWLEY, 2004). Assim, apesar das fêmeas da prole das ratas exercitadas com sobrecarga apresentarem maior função mitocondrial no músculo gastrocnêmio lateral, esse efeito só é maior quando comparado às fêmeas do grupo controle.

Existem evidências na literatura demonstrando adaptações sexo dependentes no músculo esquelético de roedores. Colom *et al.* (2007) demonstraram que ratas

fêmeas tiveram maiores adaptações no músculo gastrocnêmio em um modelo de restrição calórica, demonstrando maior imunocnteúdo de TFAM, bem como maior massa e atividade mitocondrial comparada aos machos. Já Farhat *et al.* (2017) demonstraram que o exercício aeróbico induziu um aumento mais expressivo na função mitocondrial no músculo esquelético dos ratos machos em comparação às fêmeas. Outros estudos demonstram também que as fêmeas possuem maior proporção de fibras do tipo I, maiores estoques de lipídeos intramusculares e maior oxidação lipídica no músculo do que machos (LANDEN *et al.*, 2019; MONTERO *et al.*, 2018). Fêmeas também demonstram utilizar menos carboidratos e proteínas como substrato energético durante a realização de exercícios aeróbicos em comparação aos machos, o que denota uma maior capacidade oxidativa (LANDEN *et al.*, 2019; MONTERO *et al.*, 2018; TARNOPOLSKY, 2008). Esses estudos demonstram diversos exemplos de dimorfismo sexual em relação ao músculo esquelético, porém vale a pena ressaltar que os estudos citados acima não foram realizados com o mesmo modelo experimental utilizado em nosso estudo e isso deve ser considerado.

Com isso em mente, é possível inferir que as fêmeas, prole das ratas exercitadas, expressem maior proporção de fibras do tipo I ou possuam maiores alterações no metabolismo do músculo gastrocnêmio lateral como efeito do exercício materno em relação aos machos, uma vez que o músculo gastrocnêmio é mais heterogêneo no que diz respeito a proporção dos tipos de fibras musculares e propriedades metabólicas quando comparado ao músculo sóleo (CORNACHIONE *et al.*, 2011).

As mitocôndrias não são responsáveis somente por suprir as demandas energéticas celulares, mas também por produzir ROS (BOLISSETTY e JAIMES, 2013;

VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). Está bem estabelecido que o exercício físico aeróbico aumenta a produção de ROS pela mitocôndria, e que essas podem causar danos ao DNA, lipídeos e proteínas, induzindo estresse oxidativo (VIÑA *et al.*, 2000). Entretanto, na última década, diversos estudos vêm demonstrando que as ROS produzidas durante o exercício podem ser um dos eventos responsáveis por efeitos benéficos, agindo como sinalizadores intracelulares, induzindo o aumento na expressão das defesas antioxidantes em diversos tecidos (MARCELINO *et al.*, 2013; RECH *et al.*, 2014; STONE *et al.*, 2019; VIÑA *et al.*, 2000; VINA *et al.*, 2012). Por outro lado, não existem evidências, até o momento, demonstrando se o exercício materno durante a gestação pode alterar o estado redox no músculo esquelético da prole, sendo o nosso estudo, até onde sabemos, o primeiro a avaliar esse parâmetro no músculo esquelético da prole de ratas exercitadas no período gestacional. Assim sendo, em relação ao estado redox, observamos alterações mais expressivas nas fêmeas, prole das ratas exercitadas com sobrecarga durante a gestação, principalmente no gastrocnêmio lateral, embora também se observe diversos efeitos sexo dependentes no músculo sóleo. De maneira geral, as fêmeas nascidas das mães exercitadas demonstram menor atividade de enzimas antioxidantes, bem como menores níveis de GSH, principal antioxidante não enzimático celular, quando comparadas aos machos da prole. Entretanto, apesar de observarmos menor atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de GSH nesses animais, isso não se refletiu em nenhum tipo de dano, visualizado a partir dos níveis de carbonilas, um marcador de dano a proteínas, encontrado diminuído em ambos os músculos nas fêmeas. A diminuição observada nas defesas antioxidantes, assim como o conteúdo reduzido de carbonilas, corrobora com os resultados observados nos níveis totais de oxidantes, que está diminuído nas fêmeas, nesse contexto, dado o fato de que os

oxidantes podem induzir um aumento na expressão das defesas antioxidantes, a menor produção dos mesmos observados nas fêmeas, indica uma adaptação das defesas antioxidantes ao mesmo nível das ameaças oferecidas pelos níveis de oxidantes produzidos na célula. Já em relação aos machos, não observamos diferenças nas defesas antioxidantes, bem como na produção de oxidantes e conteúdo de carbonilas, assim sendo, a lógica aplicada aqui é a mesma da aplicada às fêmeas, ou seja, a não alteração na produção de oxidantes não se reflete na necessidade de alterar as defesas antioxidantes.

Tendo a mitocôndria como a principal produtora de ROS nas células, é cabível imaginar que ela está no centro das alterações encontradas em nosso estudo. Ademais, diversos estudos já demonstraram que as principais diferenças antioxidantes entre machos e fêmeas são encontradas na mitocôndria (MALORNI *et al.*, 2007; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2017; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). Já foi reportado que fêmeas produzem menos H₂O₂ que machos, e consequentemente são menos suscetíveis ao dano oxidativo, como observado nas fêmeas, prole das mães exercitadas durante a gestação em nosso estudo (MALLAY *et al.*, 2019; VIÑA *et al.*, 2005). Farhat *et al.* (2017) também demonstraram que fêmeas treinadas, apesar de demonstrarem menor atividade das enzimas antioxidantes, são mais resistentes à redução da função mitocondrial induzida por ROS e danos oxidativos a lipídeos, observados pelo conteúdo de malondialdeído (MDA), do que os machos.

Assim sendo, as diferenças sexo dependentes no estado redox observadas em nosso estudo podem ser devidas às diferenças hormonais entre machos e fêmeas, mais especificamente ao hormônio estrogênio. Apesar de machos também o possuírem, ele é principalmente um hormônio sexual feminino (ENNS e TIIDUS, 2010). Os efeitos protetivos do estrogênio já foram muito bem caracterizados em

uma revisão publicada por Enns e Tiidus (2010), os quais relatam seus efeitos antioxidantes e estabilizador de membranas, bem como regulando a expressão de diversos genes, inclusive na própria mitocôndria (VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). Ademais, alguns estudos já demonstraram que o exercício físico aumenta a expressão de receptores de estrogênio alfa (ER α), encontrados na musculatura esquelética, incluindo na mitocôndria (HAMILTON *et al.*, 2016; LEMOINE *et al.*, 2002; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). Além disso, o estrogênio tem a capacidade de ligar-se aos receptores ER α , que por sua vez são conhecidos por ativarem fatores de transcrição como o PCG-1 α e os fatores respiratórios nucleares (NRFs), que estão relacionados com a biogênese mitocondrial e a expressão de defesas antioxidantes na célula, respectivamente (VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). O estrogênio ainda possui a capacidade de se ligar diretamente aos receptores encontrados nas mitocôndrias, levando à replicação do DNA mitocondrial e também a expressão de enzimas antioxidantes mitocondriais como a SOD dependente de manganês (Mn-SOD) (VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2019). Por fim, o estrogênio pode estar por trás da modulação do estado redox observada em nosso estudo, dada a sua participação nos processos citados anteriormente ou, simplesmente por estar agindo como um neutralizador de oxidantes, devido a sua estrutura química similar à de outros antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina E (ENNS e TIIDUS, 2010), o que pode explicar a redução no conteúdo de oxidantes encontrado nas fêmeas.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados adicionam evidências importantes aos dados da literatura relacionada à DOHaD, demonstrando que o exercício materno causa efeitos sexo dependentes na prole de ratas exercitadas durante a gestação. Demonstramos que o exercício materno em intensidade moderada não causa efeitos negativos no desenvolvimento neuromotor e físico anatômico da prole no período neonatal. Além disso, também mostramos que o exercício materno é capaz de afetar a função mitocondrial no músculo esquelético da prole dependendo do sexo e do tipo de fibra muscular avaliado, além de modular as defesas antioxidantes de uma maneira sexo dependente. De maneira geral, tanto os machos como as fêmeas aumentaram a função mitocondrial em decorrência do exercício materno. Além disso, as fêmeas demonstram produzir menos oxidantes e sofrerem menos danos a proteínas em comparação aos machos. Em conclusão, demonstramos que o exercício materno durante a gestação pode afetar o músculo esquelético da prole e que o sexo dos animais é um fator muito importante e que deve ser levado em consideração em futuras investigações.

REFERÊNCIAS

ALTMAN J e SUDARSHAN K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Anim. Behav**, v. 23, n. 4. p. 896-920, nov 1975.

AKHAVAN, M.M. *et al.* Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p.1173-1183. Elsevier BV, fev. 2008.

AKHAVAN M. M *et al.* Maternal Voluntary Exercise during Pregnancy Enhances the Spatial Learning Acquisition but not the Retention of Memory in Rat Pups via a TrkB-mediated Mechanism: The Role of Hippocampal BDNF Expression. **Iran J Basic Med Sci**; v. 16 p. 955-961, set 2013

American College of Obstetricians and Gynecologists. Physical activity and exercise during pregnancy and the postpartum period. **Committee Opinion** No. 650. *Obstet Gynecol.* 126 (650):e135–e142. 2015.

American College of Sports Medicine. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription.** 10th Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. 2017.

AMORIM, M. F *et al.* Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? **Experimental Physiology**, , v. 94, n. 8, p.906-913. Wiley-Blackwell, jul 2009

BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, , v. 16, n. 6, p.332-344, 29 abr. 2015. Springer Nature.

BALE, T. L *et al.* Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 4, p.314-319. Elsevier BV, ago. 2010

BAYOL, S. A.; BRUCE, C. R.; WADLEY, G. D. Growing healthy muscles to optimise metabolic health into adult life. **J Dev Orig Health Dis**, 5, n. 6, p. 420-434, Dec 2014.

BELL, M. B. *et al.* Adult skeletal muscle deletion of Mitofusin 1 and 2 impedes exercise performance and training capacity. **J Appl Physiol (1985)**, 126, n. 2, p. 341-353, Feb 1 2019.

BERGMANN, A.; ZYGMUNT, M.; CLAPP, J.f.. Running throughout pregnancy: effect on placental villous vascular volume and cell proliferation. **Placenta**, , v. 25, n. 8-9, p.694-698. Elsevier BV, set 2004.

BHARATHI, K. N; NATESH, T.S; ASHWITHA REDDY, A. Prenatal exposure to anti tubercular drugs and postnatal effect on growth, development and cognitive ability in rats. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, , v. 37, n. 1, p.203-209. Elsevier BV, abr 2012

BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Compr Physiol**, 3, n. 4, p. 1645-1687, Oct 2013.

BLAIZE, A. N *et al.* Impact of Maternal Exercise during Pregnancy on Offspring Chronic Disease Susceptibility. **Exercise And Sport Sciences Reviews**, , v. 43, n. 4, p.198-203. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), out 2015

BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e35273, 2012.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. **Int J Mol Sci**, 14, n. 3, p. 6306-6344, Mar 2013.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CALVINO-NUNEZ, C; DOMINGUEZ-DEL-TORO, E. Clonidine treatment delays postnatal motor development and blocks short-term memory in young mice. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-20, dez 2014.

CAMPS, J. *et al.* Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable diseases. **Chem Biol Interact**, 259, n. Pt B, p. 382-387, Nov 2016.

CARTONI, R. *et al.* Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. **J Physiol**, 567, n. Pt 1, p. 349-358, Aug 15 2005.

CLAPP, J. F. *et al.* Beginning regular exercise in early pregnancy: Effect on fetoplacental growth. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, , v. 183, n. 6, p.1484-1488. Elsevier BV, dez. 2000.

CLAPP J.F; LOPEZ B; HARCAR-SEVIK R. Neonatal behavioral profile of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 180 p. 91-95. Jan 1999.

CLAPP, J. F. Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. **The Journal Of Pediatrics**, Cleveland, v. 129, n. 6, p.856-863, dez. 1996.

CLAPP, J. F. One year morphometric and neurodevelopmental outcome of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** v. 178, n. 3 p.594-599. ago 1998.

CLAPP, J. F. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, v. 110, p.80-85. Elsevier BV, set. 2003.

CHEN, C. *et al.* Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. **Toxicol Sci**, v. 125, n. 1, p. 248-61, Jan 2012.

Committee Opinion No. 650. **Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], v. 126, n. 6, p.135-142. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health) dez. 2015.

CORNACHIONE, A. S. *et al.* Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. **Acta Histochem Cytochem**, 44, n. 2, p. 43-50, Apr 2011.

COSTELLO, J. T.; BIEUZEN, F.; BLEAKLEY, C. M. Where are all the female participants in Sports and Exercise Medicine research? **Eur J Sport Sci**, 14, n. 8, p. 847-851, 2014.

DE CASTRO, V. L. Considerações Metodológicas a Respeito da Avaliação do Desenvolvimento Animal. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Pesticidas P.Téc.Cient., Curitiba v.5 p.53-68, 1995.

DE CASTRO, V. L *et al.* Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, , v. 28, n. 6, p.1249-1259. Elsevier BV, nov. 2007.

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. **Obstet Gynecol**, 120, n. 2 Pt 1, p. 302-310, Aug 2012.

DISTLER, M. G.; PALMER, A. A. Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. **Front Genet**, 3, p. 250, 2012.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab**, 17, n. 2, p. 162-184, Feb 5 2013.

ENNS, D. L.; TIIDUS, P. M. The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. **Sports Med**, 40, n. 1, p. 41-58, Jan 2010.

EYSER, Charles J.. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. **Current Protocols In Neuroscience**, , p.1-15. John Wiley & Sons, fev. 2004.

FALCÃO-TEBAS, F *et al.* Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **British Journal Of Nutrition**, , v. 107, n. 03, p.372-377. Cambridge University Press (CUP). jul. 2011.

FERRARO, Z.M; GAUDET, L; ADAMO, K B. The Potential Impact of Physical Activity During Pregnancy on Maternal and Neonatal Outcomes. **Obstetrical & Gynecological Survey**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.99-110. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), fev. 2012.

GALLAHUE, D. L; OZMUN, J. C; GOODWAY J. D. **Compreendendo o Desenvolvimento Motor: Bebês, Crianças, Adolescentes e Adultos**. 7 edição. São Paulo. AMGH Editora. 2013.

GIRIKO, C. A *et al.* Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, , v. 31, n. 8, p.731-739, Elsevier BV. dez. 2013

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, 141, n. 2, p. 312-322, Jun 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Fifth edition. ed. Oxford University Press,, 2015 2015. 905 p.

HAMILTON, D. J. *et al.* Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. **Physiol Rep**, 4, n. 17, 09 2016.

HERNÁNDEZ-AGUILERA, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. **Mediators Inflamm**, 2013, p. 135698, 2013.

HERRING, A. *et al.* Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 1, p.117-128. FASEB, set. 2011.

HEYSER, C. J.. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. **Current Protocols In Neuroscience**, p.1-15,. John Wiley & Sons, Inc. fev. 2004

HUGHES, D. C.; ELLEFSEN, S.; BAAR, K. Adaptations to Endurance and Strength Training. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 8, n. 6, Jun 1 2018.

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**, 47, p. 69-84, 2010.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, 1, p. 244-257, Feb 8 2013.

KLEIN, C. P. *et al.* Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid-beta in Adult Offspring Rats. **Mol Neurobiol**, 56, n. 3, p. 2022-2038, Mar 2019.

LAAKSONEN, D. E. *et al.* Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, 25, n. 9, p. 1612-1618, Sep 2002.

LABONTE-LEMOYNE E, CURNIER D, ELLEMBERG D. Exercise during pregnancy enhances cerebral maturation in the newborn: A randomized controlled trial. **Journal**

Of Clinical And Experimental Neuropsychology, , v. 39, n. 4, p.347-354. Informa UK Limited, set. 2016.

LANDEN, S. *et al.* Genetic and epigenetic sex-specific adaptations to endurance exercise. **Epigenetics**, 14, n. 6, p. 523-535, Jun 2019.

LASHLEY, C. J. *et al.* Effect of pregnancy on the uterine vasoconstrictor response to exercise in rats. **Physiol Rep**, 3, n. 3, Mar 2015.

LEE, H.H *et al.* Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain And Development**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.147-154. Elsevier BV, abr. 2006.

LEMOINE, S. *et al.* Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, 174, n. 3, p. 283-289, Mar 2002.

LEMOYNE, E. L *et al.* The effects of exercise during pregnancy on the newborn's brain: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-7, Springer Nature, maio 2012.

MALLAY, S. *et al.* Sex-dependent Differences in the Bioenergetics of Liver and Muscle Mitochondria from Mice Containing a Deletion for. **Antioxidants (Basel)**, 8, n. 8, Jul 2019.

MALORNI, W. *et al.* Redox features of the cell: a gender perspective. **Antioxid Redox Signal**, 9, n. 11, p. 1779-1801, Nov 2007.

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**, 246, p. 28-39, Aug 29 2013.

MCCLOSKEY, K *et al.* The association between higher maternal pre-pregnancy body mass index and increased birth weight, adiposity and inflammation in the newborn. **Pediatric Obesity**, p. 1-8. Wiley-Blackwell, ago 2016.

MELO, A. S. de Oliveria *et al.* Effect of a Physical Exercise Program During Pregnancy on Uteroplacental and Fetal Blood Flow and Fetal Growth. **Obstetrics & Gynecology**, , v. 120, n. 21, p.302-310. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), ago 2012.

MENDES-DA-SILVA, C *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Neuropsychiatry** , v. 72, n. 2, p.136-144, fev. 2014.

MEY, J. T.; HAUS, J. M. Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Front Cardiovasc Med**, 5, p. 117, 2018.

MIKOVIC, J.; LAMON, S. The effect of maternal metabolic status on offspring health: a role for skeletal muscle? **J Physiol**, 596, n. 21, p. 5079-5080, 11 2018.

MONTERO, D. *et al.* Sexual dimorphism of substrate utilization: Differences in skeletal muscle mitochondrial volume density and function. **Exp Physiol**, 103, n. 6, p. 851-859, 06 2018.

MOYER, C; REOYO, O. R; MAY, L. The Influence of Prenatal Exercise on Offspring Health: A Review. **Clinical Medicine Insights: Women's Health**, v. 9, p.37-43, jan. 2016.

MYERS, J. *et al.* Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. **Am J Med**, 117, n. 12, p. 912-918, Dec 2004.

NARAYANAN C. H, FOX M. W, HAMBURGER V. Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*rattus norvegicus albinus*). **Behaviour..** v. 40 n. 1 p. 100–133. 1971.

PAPALIA, D. e; FELDMAN, R. D. **Desenvolvimento Humano**. 12. Edição, São Paulo: AMGH Editora. 2013.

PARÍZKOVÁ J. Pregnancy, Exercise and Late Effects in the Offspring until Adult Age. **SOJ Gynecol Obstet Womens Health**. Open acess, v. 3 n. 2 p. 1-6, jul 2017.

PATTANAKUHAR, S. *et al.* The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application. **Obes Res Clin Pract**, 11, n. 5 Suppl 1, p. 112-132, 2017 Sep - Oct 2017.

POWERS, S. K. *et al.* Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Compr Physiol**, 1, n. 2, p. 941-969, Apr 2011.

POWERS, S. K.; RADA, Z.; JI, L. L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. **J Physiol**, 594, n. 18, p. 5081-5092, Sep 15 2016.

RECH, A. *et al.* The effects of strength, aerobic, and concurrent exercise on skeletal muscle damage in rats. **Muscle Nerve**, 50, n. 1, p. 79-86, Jul 2014.

SANTOS, C. M. *et al.* Effect of maternal exercises on biophysical fetal and maternal parameters: a transversal study. **Einstein (Sao Paulo)**, 14, n. 4, p. 455-460, Oct-Dec 2016.

SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, 106-107, p. 1-16, Jul-Aug 2013.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, 4, p. 180-183, 2015.

STONE, V. *et al.* Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. **J Nutr Biochem**, 67, p. 138-148, May 2019.

TAKITO, M. Y e BENÍCIO, M. H. D. Physical activity during pregnancy and fetal outcomes: a case-control study. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p.90-101, fev. 2010.

TAMASHIRO, K. L *et al.* Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. **Biol Reprod**, v. 63, n. 1, p. 328-34, Jul 2000.

TARNOPOLSKY, M. A. Sex differences in exercise metabolism and the role of 17-beta estradiol. **Med Sci Sports Exerc**, 40, n. 4, p. 648-654, Apr 2008.

THEILEN, N. T.; KUNKEL, G. H.; TYAGI, S. C. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. **J Cell Physiol**, 232, n. 9, p. 2348-2358, Sep 2017.

THORNALLEY, P. J. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. **Biochem Soc Trans**, 31, n. Pt 6, p. 1343-1348, Dec 2003.

USTUNEL, I.; DEMIR, R. A histochemical, morphometric and ultrastructural study of gastrocnemius and soleus muscle fiber type composition in male and female rats. **Acta Anat (Basel)**, 158, n. 4, p. 279-286, 1997.

VENTURA-CLAPIER, R. *et al.* Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. **Clin Sci (Lond)**, 131, n. 9, p. 803-822, May 2017.

VENTURA-CLAPIER, R. *et al.* Estrogens, Estrogen Receptors Effects on Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondria. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 557, 2019.

VIÑA, J. *et al.* Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **FEBS Lett**, 579, n. 12, p. 2541-2545, May 2005.

VIÑA, J. *et al.* Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life**, 50, n. 4-5, p. 271-277, 2000 Oct-Nov 2000.

VINA, J. *et al.* Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. **Br J Pharmacol**, 167, n. 1, p. 1-12, Sep 2012.

WASINSKI, Frederick *et al.* Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p.1-11 Springer Nature, dez 2015.

WOOD, S. L.; BEYER, B. K.; CAPPON, G. D.. Species comparison of postnatal CNS development: Functional measures. **Birth Defects Research Part B:**

Developmental and Reproductive Toxicology, [s.l.], v. 68, n. 5, p.391-407. Wiley-Blackwell, out 2003.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol**, 2, n. 10, p. e348, Oct 2004.

ZORZANO, A. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, 34, n. 3, p. 433-439, Jun 2009.

ANEXO 1 – carta de aprovação do projeto pela CEUA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

Projeto Nº: 33275

Título: ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E DA CAPACIDADE CARDIORRESPIRATÓRIA DA PROLE DE RATAS EXERCITADAS DURANTE A GESTAÇÃO

Pesquisador Responsável: CRISTIANE MATTÊ

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto 26303 em reunião realizada no dia 1º/04/2019 - Sala 223 do Prédio do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de ratos Wistar, sendo 62 machos e 124 fêmeas adultos, com peso aproximado de 250 g, a fim de obter 43 fêmeas gestantes e 344 filhotes machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica/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. **Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.**

Porto Alegre, 15 de abril de 2019.


Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Coordenador da CEUA/UFRGS

ANEXO 2 - Normas de publicação da revista *Developmental Origins of Health and Disease*

Originality and copyright

To be considered for publication in *J DOHaD*, a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere. (Previously published figures may be sparingly used in Reviews, with appropriate permission.) The posting of a brief summary of clinical trial outcomes on a pharmaceutical website (such as the PhRMA-sponsored database www.clinicalstudyresults.org) will not necessarily count as prior publication nor impede full consideration of a manuscript: *J DOHaD* will look at this on a case-by-case basis to determine the extent of overlap between the trial data posted and the manuscript as submitted, and will decide whether the manuscript contains a sufficiently new perspectives or sufficient additional data for it to count as original. Authors should declare when submitting manuscripts that such data have already been posted and *J DOHaD* will review this sympathetically.

Papers with multiple authors are reviewed with the assumption that all authors have contributed materially to the research reported, have approved the submitted manuscript and concur with its submission to *J DOHaD*.

Author Publication Agreement

The policy of *Developmental Origins of Health and Disease* is that authors (or in some cases their employers) retain copyright and grant the International Society for Developmental Origins of Health and Disease a licence to publish their work. In the case of gold open access articles this is a non-exclusive licence. Authors must complete and return an author publishing agreement form as soon as their article has been accepted for publication; the journal is unable to publish the article without this. Please download the appropriate publishing agreement [here](#).

For open access articles, the form also sets out the [Creative Commons licence](#) under which the article is made available to end users: a fundamental principle of open access is that content should not simply be accessible but should also be freely re-usable. Articles will be published under a Creative Commons Attribution license (CC-BY) by default. This means that the article is freely available to read, copy and redistribute, and can also be adapted (users can “remix, transform, and build upon” the work) for any commercial or non-commercial purpose, as long as proper attribution is given. Authors can, in the publishing agreement form, choose a different kind of Creative Commons license (including those prohibiting non-commercial and derivative use) if they prefer.

Authorship

All individuals included as authors of papers must have contributed substantially to the scientific process leading up to the writing of the paper. Such contribution includes the conception and design of the project, the performance of experiments and the analysis and interpretation of data. In addition the author should have made a substantial contribution to drafting or critical revision of the manuscript for important intellectual content.

We are aware that authors sometimes receive assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication. Such assistance must be noted in the cover letter and in the Acknowledgements section along with a declaration that the author(s) are entirely responsible for the scientific content of the paper.

Failure to acknowledge assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication in the Acknowledgements section may lead to disqualification of the paper.

Under no circumstances will J DOHaD accept submissions by writing or editorial agencies on behalf of authors and there will be no correspondence with writing or editorial agencies regarding submitted or revised manuscripts.

Policy on prior publication

When authors submit manuscripts to this journal, these manuscripts should not be under consideration, accepted for publication or in press within a different journal, book or similar entity, unless explicit permission or agreement has been sought from all entities involved. However, deposition of a preprint on the author's personal website, in an institutional repository, or in a preprint archive shall not be viewed as prior or duplicate publication. Authors should follow the Cambridge University Press [Preprint Policy](#) regarding preprint archives and maintaining the version of record.

Competing Interests

All authors must include a competing interest declaration in their main manuscript file. This declaration will be subject to editorial review and may be published in the article.

Competing interests are situations that could be perceived to exert an undue influence on the content or publication of an author's work. They may include, but are not limited to, financial, professional, contractual or personal relationships or situations.

If the manuscript has multiple authors, the author submitting must include competing interest declarations relevant to all contributing authors.

Example wording for a declaration is as follows: "Competing interests: Author 1 is employed at organisation A, Author 2 is on the Board of company B and is a member of organisation C. Author 3 has received grants from company D." If no competing interests exist, the declaration should state "Competing interests: The author(s) declare none".

Authorship and contributorship

All authors listed on any papers submitted to this journal must be in agreement that the authors listed would all be considered authors according to disciplinary norms, and that no authors who would reasonably be considered an author have been excluded. For further details on this journal's authorship policy, please see this journal's [publishing ethics](#) policies.

Author affiliations

Author affiliations should represent the institution(s) at which the research presented was conducted and/or supported and/or approved. For non-research content, any affiliations should represent the institution(s) with which each author is currently affiliated.

For more information, please see our [author affiliation policy](#) and [author affiliation FAQs](#).

Manuscript preparation and style

The manuscript should be typed double-spaced throughout on 'Letter' or A4 paper. Pages should be numbered sequentially beginning with the Title Page. Margins should not be less than 2.5cm on all sides and the font should be clearly legible and uniform throughout.

A *Short Title* of up to forty-five characters should be provided on the title page and should be repeated at the top right of every following page. The names of the authors (e.g. Smith et al. or Smith and Jones) should be given at the top left of every page besides the title page.

The *Abstract* should be unstructured (i.e., no sub-headings) but must provide the reader with a self-contained summary of the paper. It should include a brief introduction to the paper, the method, the key findings, and the conclusions. A list of 3–5 key words or terms for indexing should follow the abstract.

The *Body of the Manuscript* should begin on page 3. For Regular Original Articles, Brief Reports, the formal should include: Introduction, Method, Results, Discussion and Acknowledgements. These should be followed on a new page by the References.

Tables should be consecutively numbered as they appear in the text (Table 1, etc.). Each Table should be typed on a separate sheet with the Table number and heading above and any note below.

Figures should be consecutively numbered as they appear in the text (Figure 1, 2 etc). Use italic letters for parts a, b, c etc. Use abbreviation (Fig), except where starting a new sentence. Legends should be provided for each Figure. Scale bars should be added to photomicrographs and other similar images. Figures (scale bars, pie charts, etc) should be presented in two dimensions only.

All figures submitted to Journal of Developmental Origins of Health and Disease will be published in colour on Cambridge Core Online free of charge.

Author Requirements

It is not necessary for authors to indicate that a figure should be displayed in colour. Cambridge Core will assume that any author who submits figures in colour wants and agrees to their being produced in colour online. It is the author's responsibility to declare otherwise. Colour figures must be submitted before the paper is accepted for publication, and cannot be received later in the process.

Acknowledgements

Here you may acknowledge individuals or organisations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

The Acknowledgements should be placed after the main body of the text before Financial Support. If there are no Acknowledgements, the title should be inserted followed by "None". Papers that do not include an Acknowledgements section will not be reviewed.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. This is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

The Financial Support statement should be placed after the Acknowledgements and before the Conflicts of Interest section. Papers that do not include a Financial Support statement will not be reviewed.

Conflicts of Interest

Conflict of interest exists when an author has interests that might inappropriately influence his or her judgement, even if that judgement is not influenced. Because of this, authors must disclose potentially conflicting interests so that others can make judgements about such effects. At the time of submission authors should disclose any financial arrangements or connections they may have that are pertinent to the submitted manuscript and that may be perceived as potentially biasing their paper. Non-financial interests that could be relevant in this context should also be disclosed. If no relevant interests exist, this should be stated. This requirement applies to all the authors of a paper and to all categories of papers including letters to the editor.

The Conflicts of Interest section should be placed after Financial Support. If there are no interests to declare, the title should be inserted followed by "None".

Papers that do not include a Conflicts of Interest section will not be reviewed.

Ethical Standards

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guidelines on human experimentation (please name) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008, and has been approved by the institutional committees (please name) ." and "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (please name) and has been approved by the institutional committee (please name)."

The Ethical Standards statement should be placed after the Conflicts of Interest section before the References. If the research does not involve human and/or animal experimentation, this statement should be omitted. Papers reporting the results of human and/or animal experimentation that do not contain an Ethical Standards statement will not be reviewed. For more information on the ethical standards and procedures of Cambridge Core, please visit <https://www.cambridge.org/core/services/authors/publishing-ethics>.

The requirements of DOH are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE, and authors are encouraged to consult the latest guidelines, which contain useful, general information about preparing scientific papers.

For more specialised instances of the type of trials used in your paper, please see more specific guidelines below.

Animal studies

For studies involving laboratory animals, authors should consult the Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Systematic Review/Meta-Analyses

For systematic reviews and meta-analyses, authors should consult the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement (www.prisma-statement.org/). This policy includes all systematic reviews, including those for observational studies.

Randomised trials

For reporting results of randomised trials, authors should consult the CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>), which is an evidence-based, minimum set of recommendations for reporting randomized trials.

Supplemental on-line material

The online platform gives authors the opportunity to include data that would be impossible or impractical to include in the printed version. These data might substantially enhance the

importance of the research and might also be of benefit to readers. Authors may include tables and figures as well as data such as videos, 3-D structures/images, extensive datasets and any other supplementary material not suitable for print duplication. All supplementary material must be submitted with the original manuscript. Supplementary data should be referred to in the text with the prefix "S" (e.g. Supplementary Table S1, Supplementary Figure S1). Supplementary files will not be copy-edited, and will be published as supplied.

References

References should be numbered consecutively (in superscript) as they appear in the text. Type the reference list with double-spacing on a separate sheet. References (using Index Medicus abbreviations) should appear in the style as demonstrated below. Please note that if six authors or more, the first three authors should be listed and then 'et al.'. Examples:

1. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* 2007; 97, 435-439.
2. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295, 1941-1952.
3. Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M. Metabolic and Mitochondrial Dysfunction in Early Mouse Embryos Following Maternal Dietary Protein Intervention. *Biol Reprod.* 2009 [Epub ahead of print].
4. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In *Developmental Origins of Health and Disease* (eds. Gluckman P, Hanson M), 2006; pp. 1-5. Cambridge University Press, Cambridge.

For work that is 'in press' i.e., accepted for publication but not yet published, '(In Press)' should be written in parenthesis and not the year of expected publication.

Proofs

The publisher reserves the right to copy-edit manuscripts. The corresponding author will receive page proofs for final proofreading. These should be checked and returned within 2 days of receipt. The publisher reserves the right to charge authors for excessive correction of non-typographical errors.

Offprints

The corresponding author will receive a PDF file of the article when it is published.

ORCID

We require all corresponding authors to identify themselves using [ORCID](#) when submitting a manuscript to this journal. ORCID provides a unique identifier for researchers and, through integration with key research workflows such as manuscript submission and grant applications, provides the following benefits:

- Discoverability: ORCID increases the discoverability of your publications, by enabling smarter publisher systems and by helping readers to reliably find work that you have authored.
- Convenience: As more organisations use ORCID, providing your iD or using it to register for services will automatically link activities to your ORCID record, and will enable you to share this information with other systems and platforms you use, saving you re-keying information multiple times.
- Keeping track: Your ORCID record is a neat place to store and (if you choose) share validated information about your research activities and affiliations.

See our [ORCID FAQs](#) for more information.

If you don't already have an iD, you will need to create one if you decide to submit a manuscript to this journal. You can register for one directly from your user account on ScholarOne, or alternatively via <https://ORCID.org/register>.

If you already have an iD, please use this when submitting your manuscript, either by linking it to your ScholarOne account, or by supplying it during submission using the "Associate your existing ORCID iD" button.

Supplementary materials

Material that is not essential to understanding or supporting a manuscript, but which may nonetheless be relevant or interesting to readers, may be submitted as supplementary material. Supplementary material will be published online alongside your article, but will not be published in the pages of the journal. Types of supplementary material may include, but are not limited to, appendices, additional tables or figures, datasets, videos, and sound files.

Supplementary materials will not be typeset or copyedited, so should be supplied exactly as they are to appear online. Please see our [general guidance](#) on supplementary materials for further information.

Where relevant we encourage authors to publish additional qualitative or quantitative research outputs in an [appropriate repository](#), and cite these in manuscripts.