



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

ALINE DE OLIVEIRA NETTO

CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DO
EXERCÍCIO FÍSICO (NATAÇÃO) EM RATAS
PRENHES: REPERCUSSÕES MATERNO-FETAIS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2016

ALINE DE OLIVEIRA NETTO

**CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO FÍSICO
(NATAÇÃO) EM RATAS PRENHES: REPERCUSSÕES
MATERNO-FETAIS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (área de concentração: Tocoginecologia, com ênfase em Fisioterapia).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Netto, Aline de Oliveira.

Caracterização da intensidade do exercício físico
(natação) em ratas prenhes : repercussões materno-fetais /
Aline de Oliveira Netto. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Capes: 40101150

1. Exercícios físicos aquáticos. 2. Exercícios físicos
para grávidas. 3. Natação. 4. Troca materno-fetal. 5. Rato
como animal de laboratório.

Palavras-chave: Exercício; Intensidade; Natação; Prenhez;
Ratas.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)*

Dedicatória

A **DEUS** pelo dom da vida.

Por estar comigo em todos os momentos e não me deixar desistir. Por me amparar nas dificuldades me permitindo compreender que Ele me protege quando adia meu sonho, que me diz sim mesmo quando me nega o que peço e que me livra de sofrimentos maiores quando me frustra. Ao meu Deus, por me permitir a graça de poder estudar, aprender e ensinar!

*“Referi-vos essas coisas para que tenhais paz em mim.
No mundo haveis de ter aflições. Coragem! Eu vencí o
mundo” (João 16:33)*

Aos meus pais, **ANTÔNIO ROBERTO NETTO E MAGALI APARECIDA DE OLIVEIRA NETTO.**

Ou àqueles que me fizeram sua filha. Vocês um dia sonharam comigo, me amaram antes mesmo que eu existisse. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, sempre procurando amenizar minhas ansiedades, mantendo-me firme diante dos obstáculos, numa união que me incentivava a prosseguir. O momento que vivo agora é fascinante e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Presentearam-me com a riqueza do estudo e fizeram de mim não apenas uma profissional, mas, sobretudo um ser humano. A vocês, que me ensinaram a vida, a emoção me cala ficando a certeza de que hoje lhes ofereço esta vitória. Obrigada por tudo!

Amo vocês!

*“Enquanto houver vocêS do outro lado,
aqui do outro eu consigo me orientar....Só enquanto eu
respirar, vou me lembrar de vocêS,
só enquanto eu respirar”
(Fernando Anitelli)*

A minha querida irmã, **TALITA OLIVEIRA NETTO FERREIRA.**

É sempre difícil nos revelar a quem amamos. As palavras não bastam! A não ser as que expressam quão maravilhoso e infinito é o sentimento que nos invade e nos une. Minha querida, nem imagina o quanto é especial para mim. Um ser iluminado por Deus de alma pura e coração sincero, uma linda rosa com seu próprio perfume. Nada é tão gratificante do que te ter ao meu lado, presente que Deus me deu. A infinita amizade e amor que sentimos uma pela outra nos faz mais fortes e indestrutíveis. Um ser especial, uma conselheira, amiga e irmã. Obrigada por tudo que já vivemos juntas e ainda vamos viver. Que Deus permita eternamente nossa união. Obrigada por existir na minha vida!

Amo você!

*“Entender o verdadeiro sentido das coisas, é querer saber
demais, querer saber demais...”
(O Teatro Mágico)*

Agradecimientos

A Profa. Dra. **Débora Cristina Damasceno**.

Há pessoas que marcam a nossa vida, que despertam algo especial em nós, que abrem nossos olhos de modo irreversível e transformam a nossa maneira de ver o mundo. Você é uma dessas pessoas, Profa. Os seus ensinamentos foram muito além de conteúdos de currículo. Muito obrigada pela sua dedicação, paciência e carinho ao me ensinar. Agradeço por fazer parte da minha vida, e tenha certeza de tudo o que aprendi, vou levar por toda a vida. Sempre dedicou-se a transmitir uma das maiores virtudes que se pode ter: o conhecimento. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos colaboraram para que eu fosse além dos limites e medos. Hoje sei que mestre não é quem ensina as respostas, mas, sim, quem ensina a questionar, a duvidar, a pensar e a sonhar. A você, toda minha gratidão e carinho!

Muito Obrigada!

*“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”
(Cora Carolína)*

Ao meu namorado, **Wilson Roberto Alves**.

Acredito que ninguém cruza nosso caminho por acaso, tampouco entramos na vida de alguém sem nenhuma razão. Obrigada por escolher viver sua vida ao meu lado, meu amor, meu amigo e meu companheiro. Sou profundamente grata por existir na minha vida! Sempre presente, obrigada por me direcionar um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão nos momentos que preciso. Você faz parte desta vitória. Que Deus continue abençoando nosso relacionamento. Gratidão e reconhecimento a esse amor infinito.

Amo você!

*“Espero que o tempo passe
Espero que a semana acabe
Pra que eu possa te ver de novo!*

*Espero que o tempo voe
Para que você retorne
Pra que eu possa te abraçar
E te beijar
De novo”
(Nando Reis)*

Aos amigos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetria_LAPGO: **Aline Bueno, Ana Paula Martins de Campos, Bianca Cassettari, Bruna Dallaqua Jaquie, Felipe Hiroshi Saito, Fernanda Piculo, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Gabriela Marini Prata, Giovana Vesentini, Gustavo Tadeu Volpato, Isabela Lovizutto Iessi, Kleber Eduardo Campos, Mariana Alvarez Arantes, Nathália Cristine Dias de Macedo, Rafael Bottaro Gelaleti, Silvana Barroso Corvino e Yuri Karen Sinzato**, pela convivência e ajuda durante os três anos de doutorado que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À **Franciane Quintanilha Gallego Souza**. O que teria sido de mim sem você ao meu lado, segurando minha mão, me presenteando com palavras de motivação, que me ofereceram confiança, dedicação, paciência e compreensão. Com amor as coisas ficam mais fáceis, os caminhos mais claros e os medos se dissolvem. Gratidão eterna por ter você ao meu lado e por sua doce amizade! Amo você!

À **Isabela Lovizutto Iessi** por compartilhar comigo mais uma vitória. Obrigada por me apoiar, incentivar, alertar e não me deixar desistir. Por me permitir te conhecer e caminhar ao seu lado, estando presente ou se fazendo como tal apesar da distância. Amo você!

À **Silvana Barroso Corvino**, primeiramente pela linda amizade e momentos inesquecíveis. Obrigada por me permitir entrar em sua vida e dividi-la comigo, por acompanhar meus passos nessa caminhada, que me permitiu seguir de uma maneira mais leve. Obrigado pelas risadas, companheirismo, dedicação e confiança uma com a outra. Amo você!

À **Bruna Dallaqua Jaquie** por acreditar comigo no meu sonho. Por todas as palavras, gestos, e até mesmo olhar que me fez perceber que somos

capazes. Muito obrigada por todas as vezes que me ouviu e deu seu apoio. A você todo meu carinho e gratidão, querida.

À **Yuri Karen Sinzato** por me ensinar que ninguém e nada crescem sozinhos, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. Afinal, sua compreensão, incentivo, carinho e paciência representam a alma desta vitória. Sou grata eternamente por toda ajuda, profissional e pessoal.

Às alunas **Franciane Quintanilha Gallego Souza** e **Nathália Cristina Dias de Macedo**, por dividirem comigo toda a parte prática deste trabalho, por todas as discussões, aprendizados e ensinamentos. Só quem trabalha com pesquisa em exercício físico sabe o que isso significa, são horas, dias, semanas e anos de muita dedicação, disciplina e trabalho em equipe. Obrigada pelo lindo trabalho que realizamos juntas.

À **Talísia Collachiti Moretto**, grande amiga e assistente de suporte acadêmico, pelas conversas, palavras de apoio e momentos alegres de convivência e também pelo auxílio técnico e cuidado com os animais.

Aos funcionários **Carlos Roberto Gonçalves Lima**, **Luiz Carlos Edevalter Bardella** e **Danilo Chaguri**, pelo auxílio técnico durante todo experimento.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP), especialmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente** pela contribuição no delineamento do estudo e análise estatística.

Ao Dr. **Carlos Eduardo Meirelles Santos** que criou e elaborou nosso aparelho anestésico e o novo tanque de natação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pela concessão da bolsa (Processo FAPESP 2012/25168-9).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico_CNPq** pelo auxílio financeiro.

Ao professor **Dr. Gustavo Tadeu Volpato**, pela ajuda e contribuição nas discussões durante esses anos.

À Faculdade de Medicina de Botucatu_UNESP, em especial ao **Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia** e ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** pela acolhida e concessão das dependências e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** em função do espaço físico e utilização dos aparelhos durante a realização deste trabalho.

Aos **funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, Aparecida Benedita Vasques, Ligia Maria da Silva Rodrigues, Regina Célia Gamito, Bruna Quirino da Silva Jorgetto e à Solange Sako Cagliari (secretária do programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) pela dedicação e auxílios prestados.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação** Janete Aparecida Herculano Nunes da Silva, Lilian Cristina Nunes, Diego Cezario Bovolim de Oliveira, Bruna Quirino da Silva Jorgetto, Vanessa Mores Braite e Andreia Paula Longo Devede pela dedicação e serviços prestados.

Aos **funcionários da Biblioteca da Unesp de Botucatu** pela atenção durante o período do doutorado, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Em especial aos **animais** que doaram suas vidas em prol da ciência.

ALINE DE OLIVEIRA NETTO

**REPERCUSSÕES MATERNO-FETAIS DE DIFERENTES
INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO APLICADO A
RATAS PRENHES**

(Título que será utilizado no artigo que será submetido à publicação)

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2016

SUMÁRIO

Introdução 2

Materiais e Método 6

Resultados 16

Discussão 29

Conclusão 39

Agradecimentos 40

Referências Bibliográficas 41

RESUMO

Introdução: A prática de exercícios físicos durante a gestação é bastante recomendada, entretanto, os resultados das pesquisas para indicação e/ou prescrição do exercício físico são inconclusivos devido às divergências quanto ao tipo, intensidade, frequência e duração do exercício frente às repercussões no organismo materno e fetal.

Hipótese: O limiar anaeróbio identificado em ratos machos na literatura é similar ao encontrado em ratas fêmeas não prenhes no presente estudo, mas difere das ratas prenhes. Dentre as três intensidades testadas, a mais adequada é a moderada porque deverá representar uma carga que seja possível praticar o exercício físico proporcionando melhores resultados materno e perinatais.

Objetivo: Identificar as intensidades (leve, moderada e intensa) do exercício físico de natação e relacionar essas intensidades com os resultados do desempenho reprodutivo materno e repercussões perinatais em ratas Wistar.

Método: Para identificar as três intensidades do exercício físico de natação (leve, moderada e intensa), ratas *Wistar* prenhes foram submetidas ao teste do lactato mínimo e, posteriormente, avaliadas quanto às repercussões das diferentes intensidades no organismo materno e fetal. Foi demonstrado que, a partir da determinação do limiar anaeróbio pelo teste do lactato mínimo, ratas prenhes carregariam uma carga de 1% do peso corpóreo correspondente à intensidade leve, 4% em relação à intensidade moderada e 7% para a intensa durante a prática de natação. Durante e ao final da prenhez, foram avaliados biomarcadores relacionados à gasometria, estresse oxidativo e metabolismo materno frente às diferentes intensidades do exercício físico. Na prenhez a termo foi analisada a performance reprodutiva materna e resultados perinatais.

Resultados: Foi verificado que, no teste oral de tolerância à glicose, houve melhora na captação de glicose e inalteração nos níveis de insulina sérica materna, além da prevenção nas taxas de fetos macrossômicos após a prática de natação de intensidade moderada em relação à leve, mostrando efeito benéfico desta intensidade.

Conclusão: O teste de lactato mínimo foi eficaz para identificação da intensidade de exercício físico em ratas prenhes e não prenhes. A natação de intensidade moderada foi benéfica e segura pois melhorou a sensibilidade à insulina no organismo materno, sugerindo melhoras nos resultados fetais como verificado na prevenção de macrossomia fetal.

Relevância Clínica: A partir da padronização das intensidades (leve, moderada e intensa) é possível aplicar um treinamento físico mais controlado e apropriado na gravidez.

Palavras-chave: natação, intensidade, exercício, ratas, prenhez, teste do lactato mínimo.

INTRODUÇÃO

A recomendação da prática de exercícios físicos durante a gestação data de vários anos. Entretanto, os resultados das pesquisas para indicação e/ou prescrição do exercício durante o período gestacional são inconclusivos devido às divergências quanto ao tipo, à intensidade, frequência e duração do exercício e às repercussões dessa prática nos organismos materno e fetal (Barros, 1999). Frente a estas divergências, o *American College of Sports Medicine* - ACSM (2010) recomenda a prática de exercícios físicos para gestantes por um período de 30 minutos ou mais, na intensidade moderada e, de preferência, todos os dias da semana.

Um tipo de exercício físico considerado como um dos melhores recursos para aumentar a capacidade aeróbia da gestante é a imersão aquática, pois evita os riscos de quedas e traumatismos musculoesqueléticos (Krasevec *et al.*, 1985; Otto, 1985; Bates *et al.*, 1998; Mastrocolla *et al.*, 2000). No organismo materno, foram encontrados diversos benefícios com a aplicação do exercício físico como melhora da função cardiovascular, prevenção do ganho de peso corpóreo excessivo, redução da retenção de gordura e melhora da aptidão física (Clapp, 2000a). Os resultados positivos a partir da imersão aquática estimulam a adesão das gestantes à prática do exercício e favorecem a indicação deste pelos profissionais (Krasevec *et al.*, 1985; Otto, 1985; Bates *et al.*, 1998; Mastrocolla *et al.*, 2000).

Marcadores bioquímicos do treinamento físico despertam grande interesse e representam um avanço significativo nas últimas décadas para o melhor entendimento da importância da prática do exercício físico para a saúde da população. Dentre estes marcadores, a atividade da enzima citrato sintase é estudada visto que é relevante para avaliação do metabolismo oxidativo (Basset e Howley, 2000). A citrato sintase catalisa a primeira reação do Ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação do acetil coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato para formar citrato e coenzima A (CoA) (Halliwell e Gutteridge, 1998). Vários estudos têm utilizado a atividade de enzimas mitocondriais para confirmar ou não a influência do exercício físico na adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos (Vieira *et al.*, 1988; Goodyear *et al.*, 1992; Powers *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997; Bexfield *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013). O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio (Halliwell e Gutteridge,

1998). Outro marcador utilizado é a creatina quinase (CK), uma enzima que tem um papel chave na formação de energia nas células musculares, pois é responsável por manter níveis adequados de adenosina trifosfato (ATP) durante a contração muscular (Katirji e Al-Jaberi, 2001). É estudada como marcador de dano muscular, uma vez que, sendo citoplasmática, não tem capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática (Melin *et al.*, 1997; Nosaka e Newton, 2002; Poprzęcki *et al.*, 2004). Por esse fato, o aumento da atividade da CK no soro ou plasma é utilizado como indicativo de dano na membrana muscular (Smith *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997; Close *et al.*, 2005; Nosaka *et al.*, 2005).

Associado a isso, a concentração de lactato sanguíneo também é muito investigada. Em determinada intensidade de esforço, a concentração de lactato aumenta exponencialmente à medida que a intensidade do exercício físico aumenta, mas pode variar de indivíduo para indivíduo. A maior produção de lactato ocorre pelo desequilíbrio existente entre a oferta e a necessidade de oxigênio (O₂) pela mitocôndria, resultando no aumento da conversão de ácido pirúvico em ácido láctico no citoplasma da célula. O aumento da concentração de lactato sanguíneo pode repercutir em alterações no metabolismo durante o exercício físico, com diminuição do pH sanguíneo que reduz a capacidade da célula muscular em produzir ATP ou que impede o processo contrátil (Powers e Howley, 2000). Assim, faz-se necessário um sistema que neutralize essas alterações como, por exemplo, o sistema tampão bicarbonato. O bicarbonato do tampão reage com íon hidrogênio e forma ácido carbônico, que se dissocia em dióxido de carbono (CO₂) e água, de acordo com a seguinte reação: $H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$. Como esta reação ocorre de preferência no sangue, a resultante deste tamponamento é o aumento da formação de CO₂ e, conseqüentemente, da pressão parcial de CO₂ no sangue (pCO₂) (Wasserman *et al.*, 1973). Assim, torna-se de grande valia o estudo do equilíbrio ácido básico durante a prática dos exercícios físicos.

Além disso, durante o processo de oxidação de substratos que geram energia, há formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO), que em concentrações fisiológicas ajudam a manter a homeostasia no organismo (Du *et al.*, 2003). No entanto, com a maior necessidade de consumo de oxigênio durante a prática de exercícios intensos, o O₂ é mais propenso a sofrer alterações durante sua redução até a formação de água na cadeia transportadora de elétrons, aumentando assim, o processo de formação das ERO (Halliwell e

Gutteridge, 1999; Heunks, 1999; Rowlands, 2000). Uma vez que as ERO estão em desequilíbrio com os agentes antioxidantes, há um quadro de estresse oxidativo (Osorio *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2006; Powers e Jackson, 2008).

Para o emprego e recomendação do exercício físico, testes sobre protocolos de exercício tanto para humanos, quanto para animais de experimentação, são de grande relevância visando futuras intervenções, especialmente com relação às doenças metabólicas que comprometam a condição física do indivíduo (Manchado *et al.*, 2006). No entanto, um número significativo de estudos científicos envolvendo a prática de exercícios físicos tem sido realizado em animais de laboratório, principalmente em ratos. Voltarelli *et al.* (2002) determinaram a intensidade de esforço físico em ratos machos através da análise da concentração de lactato sanguíneo durante o teste do lactato mínimo (LacMin) no exercício de natação. A partir deste teste, foi identificado o limiar anaeróbio (Lan), que é definido como o ponto onde ocorre a transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio. O teste passou a ser considerado um bom indicador do condicionamento aeróbio e tem sido utilizado na prescrição de treinamento em diferentes modalidades de exercício (Wasserman e Mcilroy, 1964; Kinderman *et al.*, 1979; Tegtbur *et al.*, 2001). No entanto, não há estudos que evidenciem as cargas correspondentes ao limiar anaeróbio em ratas fêmeas.

Em nosso laboratório de pesquisa, ratas submetidas à natação durante a prenhez apresentam resultados materno-fetais contraditórios (Damasceno *et al.*, 2013; Volpato *et al.*, 2015), visto que existem benefícios após a prática de natação só às ratas-mães ou só aos descendentes. Os resultados controversos com relação aos efeitos na prole podem ser explicados devido à intensidade do exercício físico. Na prática de exercício físico extenuante, pode ocorrer um estado de hipóxia fetal, levando a riscos para seu desenvolvimento (Bennell, 2001). De acordo com Bell (2002), exercícios físicos intensos com alta frequência e mantidos por longos períodos da gestação podem resultar em recém-nascidos com baixo peso.

Frente à inexistência de estudos sobre o limiar anaeróbio em animais fêmeas e à uma série de divergências com relação aos efeitos do exercício físico no organismo materno e fetal, há a necessidade de se identificar a intensidade de exercício físico em ratas prenhes submetidas ao exercício físico de natação. Nossa hipótese é de que os resultados do teste do lactato mínimo identificados em ratos machos é similar aos encontrados em ratas fêmeas

não prenhes, mas difere das ratas prenhes. Dentre as três intensidades testadas, a mais adequada é a moderada porque deverá representar uma carga que seja possível praticar o exercício físico com estabilização do lactato sanguíneo para melhores resultados materno e perinatais. Sendo assim, o objetivo é identificar as intensidades (leve, moderada e intensa) do exercício físico de natação com o uso do teste do lactato mínimo (LacMin) em ratas prenhes e relacionar as diferentes intensidades com os resultados do desempenho reprodutivo materno e repercussões perinatais.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais

Os animais receberam cuidados de acordo com os princípios do Guia para Cuidados e Uso de Animais Experimentais. A comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista_UNESP aprovou este estudo, que foi protocolado com o número 1050-2013. Para minimizar o sofrimento animal, todos os esforços foram empregados. Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar*, em idade reprodutiva (três meses), pesando aproximadamente 250 gramas (g) e 220g, respectivamente. Os animais foram adquiridos do Centro de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas_UNICAMP e foram adaptados e mantidos no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia_UNESP sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12 horas, água e ração a vontade.

Delineamento Experimental

Adaptação do meio líquido

Na fase adulta, aos 80 dias de vida, todas as ratas foram submetidas a um período de adaptação ao meio líquido em tanques cilíndricos com 100 cm de profundidade e 30 cm de diâmetro, com água rasa (10 cm) à temperatura de $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias consecutivos por 10 minutos.

Composição dos grupos experimentais para a determinação dos limiares anaeróbios (grupos prenhe e não prenhe)

Após o período de adaptação ao meio líquido, as ratas foram submetidas à fase de acasalamento, que teve duração máxima de 15 dias e envolveu pelo menos três ciclos estrais. Cada conjunto de quatro ratas foi colocado em gaiolas de polietileno na presença de um rato macho durante o período noturno. Na manhã subsequente, os machos foram retirados das caixas e os esfregaços vaginais foram colhidos. O fator indicativo de prenhez foi a presença de espermatozoides e este foi considerado o dia 0 de prenhez (Damasceno *et al.*, 2002; Damasceno *et al.*, 2008). As ratas que não acasalaram neste período foram

consideradas inférteis (Damasceno *et al.*, 2002) e mortas por inalação excessiva (overdose) de dióxido de carbono. Durante o período de acasalamento das ratas selecionadas para compor o grupo prenhe (n=5), essas ratas e as não prenhes (n=5) continuaram a ser submetidas a tanques com água rasa.

Teste do lactato mínimo (LacMin)

Para a determinação do limiar anaeróbio das ratas prenhes e não prenhes, foi realizado o teste LacMin, que consiste em um teste de esforço físico com indução de hiperlactacidemia, um período de descanso seguido do teste incremental. Para isso, as ratas prenhes foram submetidas ao teste LacMin nos dias 7, 10, 14, 17 e 20 de prenhez e, nos respectivos dias de experimento, o teste foi aplicado às ratas não prenhes de forma pareada, perfazendo um total de cinco testes LacMin por rata durante todo o experimento. As ratas prenhes e não prenhes permaneceram em contato com o meio líquido do dia 0 ao dia 6 de prenhez, tendo em vista que a implantação embrionária nas ratas ocorre próximo ao 5º dia de prenhez, todas as ratas prenhes foram submetidas ao LacMin a partir do 7º dia de prenhez para evitar possíveis perdas embrionárias, seguidas de forma pareada com as ratas não prenhes. Para o LacMin, as ratas prenhes e não prenhes foram colocadas nos mesmos tanques cilíndricos do período de adaptação, mas com água na profundidade de 40 cm e carregaram cargas de 50% do peso corporal, com cintas atadas ao tórax contendo “chumbinhos” de pesca como carga. Com esta carga, as ratas realizaram saltos na água durante seis minutos (sendo 30 segundos de saltos seguidos de 30 segundos de repouso até completar os seis minutos) para induzir a hiperlactacidemia.

Ao final deste teste, as ratas permaneceram em repouso por nove minutos. Posteriormente, as ratas prenhes e não prenhes foram submetidas ao teste incremental, que consistiu do exercício de natação no qual as ratas carregaram as cargas progressivas de 3% a 7% do peso corpóreo, variando de 0,5 em 0,5% nos dias 7, 10, 14, 17 e 20. O exercício aplicado teve duração de três minutos para cada carga, seguido de coletas de amostras de sangue para análise das concentrações de lactato a cada troca de carga utilizando tiras específicas no aparelho Accutrend® Plus (Roche®, Alemanha) (modificado Voltarelli *et al.*, 2002) (Figura 1). Nos dias em que as ratas não realizaram o teste LacMin, elas

permaneceram no tanque com água rasa (10 cm) na mesma temperatura para não perder o contato com o meio líquido.

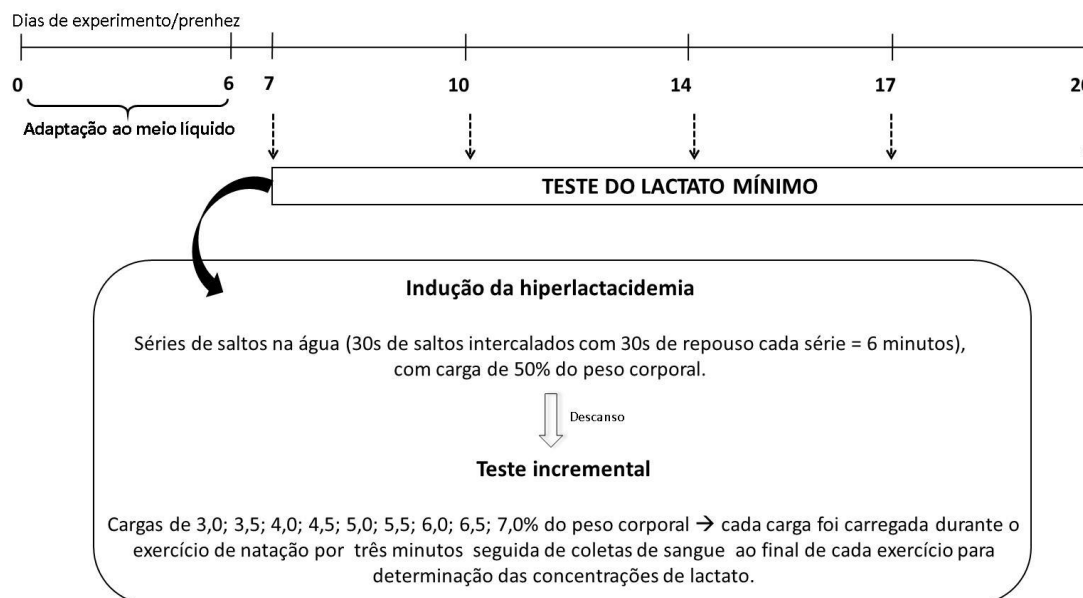


Figura 1. Delineamento experimental das ratas prenhes e não prenhes que realizaram o teste do lactato mínimo no protocolo de natação.

A escolha dos dias 7, 10, 14, 17 e 20 de prenhez (para as ratas prenhes) e de experimento (para as ratas não prenhes) foi padronizada com o objetivo de identificar cargas que refletissem as intensidades de exercício (leve, moderada ou intensa) para esta população de animais e para verificar se há variação do limiar anaeróbico de acordo com as alterações progressivas do peso corpóreo durante a prenhez ou não comparando com ratas não prenhes. De acordo com cada carga e sua respectiva concentração de lactato sanguíneo, é obtida uma curva polinomial de ordem 2, em “U”, e o limiar anaeróbico é dado pelo valor mais baixo da concentração de lactato na carga correspondente.

Aplicação da natação nas intensidades leve, moderada e intensa determinadas a partir do teste do LacMin em ratas prenhes

Outro grupo de ratas seguiu o mesmo protocolo de adaptação ao meio líquido e acasalamento. As ratas prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais constituídos por: 1) Não exercitado (grupo controle - sem carga); 2) Exercício Leve; 3) Exercício Moderado; 4) Exercício Intenso.

Considerando que o limiar anaeróbio (Lan) é o ponto de transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio, foi verificado neste estudo que o Lan de ratas prenhes encontrava-se na carga de 5% do peso corpóreo. Sendo assim, para se trabalhar dentro do metabolismo aeróbio, foi padronizada a carga correspondente a 80% desse limiar anaeróbio para a prática de exercício físico de intensidade moderada, sendo representada pela carga de 4% do peso corpóreo do animal. Já para o exercício físico de intensidade leve, foram padronizados 20% do Lan, trabalhando ainda dentro do metabolismo aeróbio, sendo representado pela carga de 1% do peso corpóreo, o que equivale a uma carga mínima para execução do exercício. Para o exercício físico de intensidade intensa, foi padronizada a carga de 7% do peso corpóreo, carga superior ao Lan, isto é, equivalente a 140% desse limiar, visando à prática de exercício no metabolismo anaeróbio.

Prática do exercício físico de natação das ratas prenhes

Do dia 0 ao 6º dia de prenhez, as ratas permaneceram nos tanques contendo água rasa (10 cm) à temperatura de $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O primeiro dia de exercício físico foi realizado no 7º dia de prenhez considerando que o período de implantação embrionária na rata ocorre próximo ao 5º dia. A natação foi realizada de acordo com a intensidade de exercício físico e, para isso, cada rata carregou sua respectiva carga. “Chumbinhos” de pesca foram utilizados como cargas e inseridos em coletes, atados ao tórax da rata. O exercício foi realizado no período da manhã durante 30 minutos diários. As ratas foram submetidas à natação do dia 7 ao dia 20 de prenhez.

Avaliação dos parâmetros maternos

Análise dos marcadores do estresse oxidativo

Nos dias 0 e 20 de prenhez, as ratas dos grupos não exercitado e exercitados foram submetidas à anestesia inalatória à base de isoflurano (dose de 1 mL/min). Após procedimento anestésico, foram coletadas amostras de sangue total (n=8 ratas/grupo/dia) para a análise de marcadores de estresse oxidativo [malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), grupos tióis reduzidos]. As amostras foram coletadas por punção cardíaca em tubos contendo anticoagulante (heparina). As amostras foram processadas de acordo

com metodologia modificada do trabalho de de Souza *et al.* (2010). O material hemolisado foi armazenado em freezer a -80°C e analisado por espectrofotometria.

No 21º dia de prenhez, após anestesia, foi realizada coleta de fígado materno (n=8 ratas/grupo) para análise de lipoperoxidação através da concentração de malondialdeído (MDA) para avaliar o metabolismo materno em resposta às diferentes intensidades de exercício físico. As amostras de fígado foram armazenadas em freezer a -80°C. Para as dosagens, o tecido foi homogeneizado e as concentrações de MDA foram analisadas através de kits comerciais Cayman® (*TBARS Assay Kit 10009055_Cayman® Chemical Co., Ann Arbor, Michigan, U.S.A.*).

Determinação da atividade da creatina quinase (CK)

A partir da obtenção de plasma (n=8 ratas/grupo/dia) das amostras das mesmas ratas que foram utilizadas para análise de estresse oxidativo (dias 0 e 20 de prenhez), foram realizadas as dosagens de CK utilizando kit comercial (*EnzyChrom™ Creatine Kinase Assay Kit® - ECPK 100*).

Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e determinação de insulina sérica

Para avaliar a tolerância à glicose alterada fisiologicamente durante a prenhez e a captação da glicose, sem utilização de insulina, promovida pelo exercício, o TOTG foi realizado no 17º dia de prenhez, que equivale à 24-28ª semana de gestação na mulher. As ratas exercitadas ou não foram submetidas a seis horas de jejum e, em seguida anestesiadas por via inalatória para coleta de amostras de sangue total por punção cardíaca em tubos secos para dosagem de insulina sérica (n=8 ratas/grupo). As dosagens de insulina foram realizadas por kits comerciais de microplaca de ELISA® (Crystal Chem Inc.®).

O TOTG (n=8 ratas/grupo) foi iniciado após recuperação anestésica das ratas. Para isso, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, foram determinadas as glicemias (Sinzato *et al.*, 2012) em glicosímetro convencional (*One Touch Ultra, Johnson, Johnson®*). Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

Determinação da atividade da citrato sintase (CS)

No 21º dia de prenhez, após anestesia, foi realizada a coleta de amostras do músculo gastrocnêmio das ratas (n=8 amostras/grupo) para análise enzimática de citrato sintase. Este parâmetro foi determinado porque é um marcador do metabolismo oxidativo do treinamento físico. As amostras de músculo foram armazenadas em freezer a -80°C. Para as dosagens, o tecido foi homogeneizado e a determinação da atividade máxima da enzima baseia-se no protocolo modificado de Alp *et al.* (1976), a partir do complexo amarelo formado entre Coenzima A (CoA) liberada na reação com o DTNB [5,5-Dithiobis (2-nitro-ácido benzoico)] e foram analisadas por espectrofotometria a 412 nm.

Desempenho reprodutivo

No 21º dia de prenhez, as ratas foram submetidas à anestesia inalatória à base de isoflurano (dose de 1 mL/min). Em seguida foi realizada a laparotomia das ratas com exposição dos cornos uterinos e ovários (n=13 ratas/grupo). Depois da retirada dos cornos uterinos, foi realizada a contagem do número de implantações e de fetos vivos. A taxa de perda após a implantação embrionária foi calculada pela seguinte fórmula: número de implantações - número de fetos vivos x 100 / número de implantações (Damasceno *et al.*, 2008). Foi analisada e considerada a quantidade de ratas que apresentaram taxas de perda pós-implantação maiores que 10%, visto que a média percentual desta taxa no grupo não exercitado em nosso laboratório corresponde a 7% ± 3%. Em seguida, os recém-nascidos foram retirados dos cornos uterinos, analisados externamente e pesados em balança analítica.

Determinação gasometria arterial e lactato sanguíneo

A análise da gasometria arterial (equilíbrio acidobásico) foi realizada em outro grupo de animais diferente dos anteriores, uma vez que para coleta de sangue arterial foi preciso ter acesso à artéria aorta abdominal. Desta forma, as ratas submetidas a este procedimento foram anestesiadas e mortas ao final do experimento. Para isso, ratas foram distribuídas em grupos experimentais (n=5 animais/grupo): 1) Não exercitado, 2) Exercício leve, 3) Exercício moderado, 4) Exercício intenso. Todos os animais desses grupos foram mortos em três momentos diferentes (0, 7 e 21), sendo n=5 animais/dia/grupo.

Para a coleta de sangue arterial através de punção da aorta, as ratas foram anestesiadas por via inalatória e, quando se encontravam em plano anestésico e com respiração estável, foi realizada a laparotomia e a coleta do sangue arterial. As amostras foram coletadas em tubos contendo anticoagulante (heparina). Após colheita das amostras, três gotas de sangue foram utilizadas para determinação de pH, pCO₂, HCO₃ e lactato no aparelho i-Stat System® (Abbott, Princeton, New Jersey). A saturação de oxigênio foi utilizada como parâmetro para confirmar amostras de sangue arterial e foi utilizada como critério de inclusão, assim, ratas com valores acima de 95% participaram das análises de gasometria.

Avaliação dos recém-nascidos

Classificação dos pesos corpóreos dos recém-nascidos

Após a retirada dos recém-nascidos dos cornos uterinos e pesagem dos mesmos, foi realizada a classificação dos pesos corporais de acordo com a média $\pm 1,7 \times$ desvio-padrão (DP) dos pesos corporais obtidos do grupo não exercitado, que determina três classes diferentes de recém-nascidos dentro dos grupos estudados: pequeno para idade de prenhez (PIP), cujo peso é inferior à média - $1,7 \times$ DP; adequado para a idade de prenhez (AIP), cujo peso é compreendido entre a média $\pm 1,7 \times$ DP e grande para a idade de prenhez (GIP), cujo peso é maior que a média + $1,7 \times$ DP (Ilessi *et al.*, 2010).

Análise da frequência de anomalias externas dos recém-nascidos

Os recém-nascidos foram examinados quanto à conformação craniana, implantação das orelhas, presença de olhos (fechados) e boca (fenda labial, macroglossia), membros anteriores e posteriores (ausência ou excesso de falanges, posição, tamanho), regiões torácicas, abdominal e dorsal (hemorragia, hematoma e defeito de fechamento do tubo neural) e presença de perfuração anal (Damasceno *et al.*, 2008).

Determinação de adiponectina sérica e triglicerídeos hepáticos

Após pesagem e classificação dos pesos corpóreos, os recém-nascidos foram anestesiados com tiopental sódico (Tiopentax®) e, em seguida, foram decapitados para coleta de sangue total em tubos secos para obtenção de amostras de soro para determinação de adiponectina. Foi realizado um *pool* com o sangue da ninhada de cada rata

mãe (n=8 *pool da ninhada/grupo*). As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo do fabricante (Millipore® EZRADP-62K) por microplacas de Elisa®. Posteriormente, foi realizada a laparotomia dos recém-nascidos (RN) e os fígados foram coletados (n=2 RN/mãe, sendo n=8 mães/grupo) e armazenados em freezer a -80°C, os quais foram processados para obtenção do sobrenadante para posterior determinação da concentração de triglicérides utilizando metodologia modificada do *kit* comercial da Wiener® (Rosário, Argentina).

Análise Estatística

De acordo com o estatístico do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), para o cálculo do tamanho amostral para o teste de lactato mínimo, uma rata seria suficiente para determinar o limiar anaeróbio, mas optou-se por utilizar cinco ratas por grupo levando em consideração a média deste limiar para maior confiabilidade no menor valor de lactato. Não necessitando, portanto, de cálculo do tamanho amostral. Com relação aos parâmetros bioquímicos, foi considerada a média da concentração de insulina para o grupo não exercitado de $1,40 \pm 0,34$ e para o exercício leve de $1,13 \pm 0,14$ com poder de 80% e confiabilidade de 95%, assim o tamanho amostral mínimo seria de cinco animais por grupo.

Os resultados dos testes do lactato mínimo entre os diferentes dias de prenhez e experimento (não prenhe) foram estatisticamente analisados por comparação entre as médias dos dias estudados utilizando ANOVA (análise de variância). No mesmo teste, as comparações dos limiares entre os grupos e as concentrações de lactato sanguíneo no limiar anaeróbio entre os grupos prenhe e não prenhe foram estatisticamente analisados pelo Teste T.

Os resultados da atividade de creatina quinase, marcadores de estresse oxidativo no sangue e fígado, gasometria, ganho de peso durante a prenhez, lactato sanguíneo, citrato sintase maternos, adiponectina e triglicerídeos fetais foram estatisticamente analisados por comparação entre as médias das variáveis dos grupos utilizando ANOVA (análise de variância) seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Com relação à análise de medidas proporcionais, como a classificação de peso corpóreo dos recém-nascidos, foi comparada pelo Teste Exato de Fisher e as porcentagens de perdas pós-embrionárias por Distribuição de Poisson. Para o desempenho reprodutivo materno, foi utilizada a

Distribuição de Poisson. Para a análise das glicemias no teste oral de tolerância à glicose (TOTG), foi utilizada ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para um delineamento em medidas repetidas comparando a interação entre momentos (0, 30, 60, 120 minutos) e grupos (não exercitado, intensidade leve e intensidade moderada). Para análise dos dados de insulina sérica, foi utilizada a Distribuição Gama.

Pelo fato dos grupos exercício leve, moderado e intenso não apresentarem diferenças estatisticamente no dia 0 de prenhez nos parâmetros de gasometria com relação ao grupo não exercitado, foi considerado apenas um grupo no dia 0. O grupo exercício intenso não suportou nadar os 30 minutos propostos no estudo, o tempo de natação desse grupo foi, em média, 14 minutos/dia durante a prenhez. Desta forma, este grupo não foi comparado aos demais grupos exercitados durante as análises das diferentes variáveis estudadas. Com relação a este grupo experimental, será apresentada apenas uma análise descritiva.

Para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Após a análise individual dos resultados entre as cargas e suas respectivas concentrações de lactato sanguíneo através do teste do lactato mínimo (LacMin), foi verificado que os valores médios das cargas relacionadas ao limiar anaeróbio das ratas não prenhes não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes dias de experimento (D7, D10, D14, D17, D20) ($p>0,05$). De forma similar, não houve diferença nos limiares anaeróbios nos dias analisados para ratas prenhes ($p>0,05$). Uma vez que não foram observadas diferenças nesses limiares, foi realizado o cálculo do valor médio das cargas considerando todos os dias em que o teste foi empregado e foi verificado que o limiar anaeróbio das ratas prenhes foi estatisticamente menor ($5,29\pm0,87$) em relação ao das ratas não prenhes ($5,78\pm0,59$) ($p<0,05$) (Figura 2).

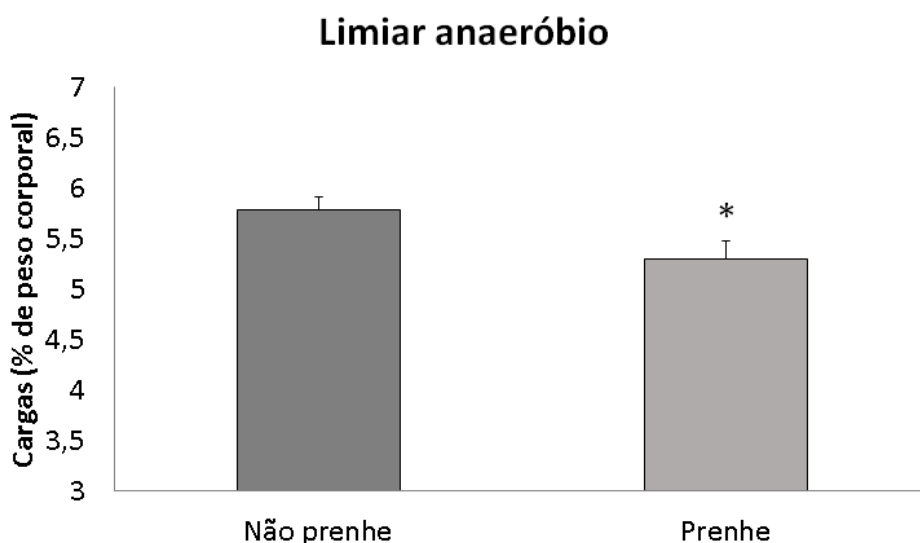


Figura 2. Análise comparativa das cargas (% de peso corporal) equivalente ao limiar anaeróbio de ratas prenhes e não prenhes em todos os dias do experimento, $n=5$ animais/grupo.

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

* $p<0,05$ – comparado ao grupo não prenhe (Teste T).

Com relação ao ganho de peso materno durante a prenhez, foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos exercício leve e exercício moderado em relação ao grupo não exercitado (Figura 3). Foi notado que as ratas do grupo exercício intenso apresentaram menor ganho de peso no decorrer da prenhez ($96,11\pm18,14$ g) e maior

porcentagem de fetos classificados como pequenos para idade de prenhez (PIP) (dados não mostrados).

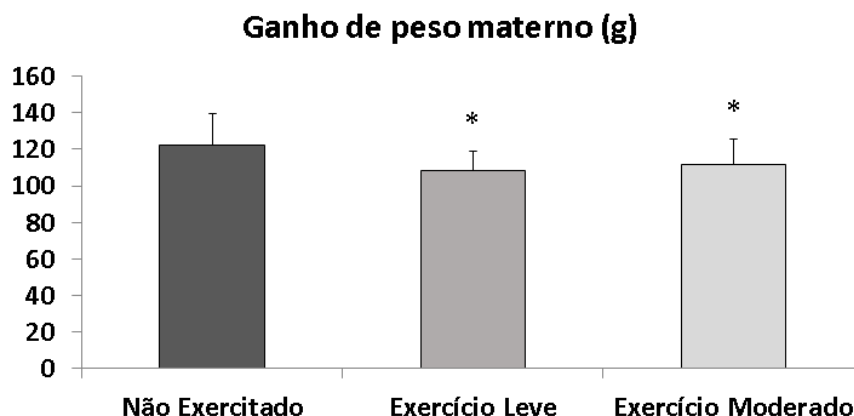


Figura 3. Ganho de peso materno de ratas não exercitadas e exercitadas nas intensidades leve e moderada durante a prenhez, n=13 animais/grupo.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo não exercitado (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

No que se refere aos biomarcadores maternos, foi observado que as atividades de creatina quinase (CK) e de citrato sintase, concentração de lactato sanguíneo e a concentração sérica de insulina analisadas durante a prenhez não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos estudados ($p > 0,05$) (Tabela 1). As atividades de CK no dia 20 de prenhez não diferiu do dia 0 em nenhum grupo experimental (dados não mostrados). As ratas do grupo exercício intenso, mesmo não nadando os 30 minutos propostos, apresentaram atividade aumentada de CK ($261,29 \pm 10,94$ U/L) no dia 20 de prenhez comparada ao dia 0 (dados não mostrados). Quanto à determinação de lactato sanguíneo, não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 1. Biomarcadores analisados nas ratas não exercitadas e exercitadas nas intensidades leve e moderada. Atividade de creatina quinase (CK) no dia 20 de prenhez, concentração de lactato sanguíneo no dia 21 de prenhez e concentração sérica de insulina de jejum no dia 17 de prenhez.

	Não exercitado (n=8)	Exercício Leve (n=8)	Exercício Moderado (n=8)
CK (U/L)	206,36±38,51	231,89±35,01	218,59±18,62
Citrato Sintase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,65±0,34	0,78±0,31	0,79±0,38
Lactato (mmol/L)	5,54 $\pm$ 1,64	5,95 $\pm$ 3,01	5,21 $\pm$ 1,18
Insulina (ng/mL)	1,40±0,34	1,13±0,14	1,57±0,82

Valores de referência: Lactato sanguíneo= 3,90-7,18 mmol/L; Creatina quinase (CK)= 182,78-252,54 U/L.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

p>0,05 – sem diferença estatisticamente significativa.

No teste oral de tolerância à glicose (TOTG) realizado no 17º dia de prenhez, foi observado que, no grupo de ratas não exercitadas, as glicemias aumentaram nos tempos 30 e 60 minutos em relação ao tempo 0, continuou alta no tempo 30 em relação aos tempos 60 e 120 e ainda permaneceu alta no tempo 60 em relação ao tempo final (120 minutos). No grupo de ratas do exercício leve, a glicemia aumentou no tempo 30 em relação ao tempo 0. Após 120 minutos da sobrecarga da glicose, as glicemias baixaram em relação aos tempos 30 e 60. O grupo exercício moderado apresentou aumento da glicemia no tempo 30 em relação ao tempo 0 e, já no tempo 60, a glicemia baixou e não diferiu do tempo 0. No tempo 120, a glicemia dessas ratas já havia baixado ($p<0,05$) (Figura 4). Quando foi fixado cada momento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos ($p>0,05$) (dados não mostrados).

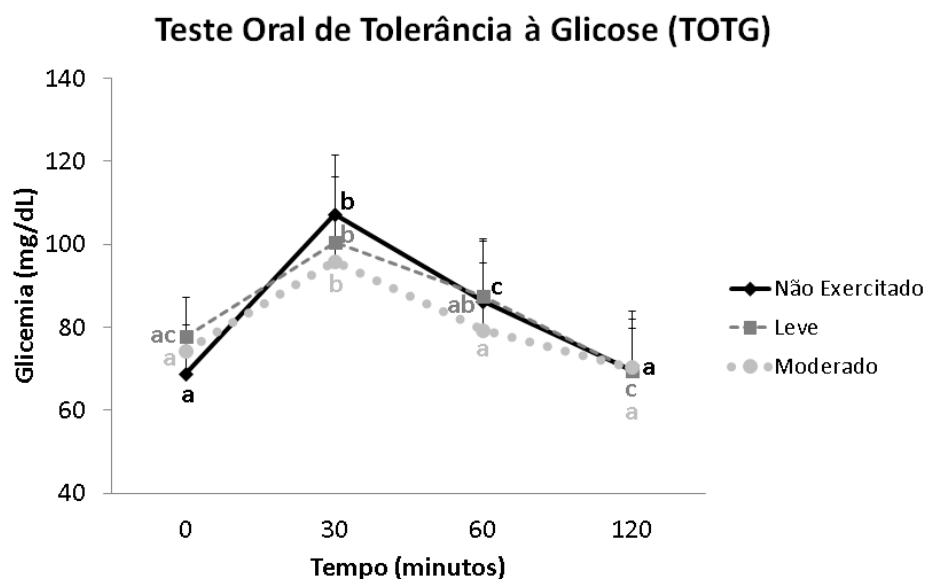


Figura 4. Teste oral de tolerância à glicose no dia 17 de prenhez de ratas não exercitadas e exercitadas em diferentes intensidades. Comparação entre as médias glicêmicas considerando os diferentes momentos de prenhez no mesmo grupo, n=8 animais/grupo.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

Médias seguidas de mesma letra minúscula (fixando grupos) não diferem significativamente por ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey com medidas repetidas ao nível de 5%.

Em relação aos marcadores de estresse oxidativo avaliado no sangue das ratas exercitadas ou não, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa no marcador de lipoperoxidação malonadeído (MDA), na atividade do antioxidante superóxido dismutase (SOD) e nas concentrações de tióis reduzidos ($p>0,05$) (Tabela 2). Os valores no dia 0 de prenhez não diferiram daqueles encontrados ao final da prenhez (dados não mostrados).

Tabela 2. Biomarcadores do estresse oxidativo analisados no dia 20 de prenhez de ratas não exercitadas e exercitadas nas intensidades leve e moderada.

	Não exercitado (n=8)	Exercício Leve (n=8)	Exercício Moderado (n=8)
MDA (nM/g Hb)	43,60 $\pm$ 9,27	37,76 $\pm$ 10,08	47,24 $\pm$ 14,87
SOD (U/mg Hb)	12,83 $\pm$ 2,36	12,70 $\pm$ 2,00	12,89 $\pm$ 3,26
Tióis Reduzidos (mM/mg de Hb)	2,66 $\pm$ 0,32	2,61 $\pm$ 0,25	2,67 $\pm$ 0,25

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

$p>0,05$ – sem diferença estatisticamente significativa.

Quanto aos níveis de MDA avaliados no fígado materno para análise do efeito do exercício físico no metabolismo, foi observado que as ratas dos grupos exercício leve e moderado apresentaram aumento nos níveis de MDA em relação às ratas do grupo não exercitado ($p < 0,05$) (Figura 5). As ratas do grupo exercício intenso também apresentam maiores níveis de MDA no fígado ($0,52 \pm 0,04$ nM/mg de proteína) em relação ao grupo não exercitado ($p > 0,05$).

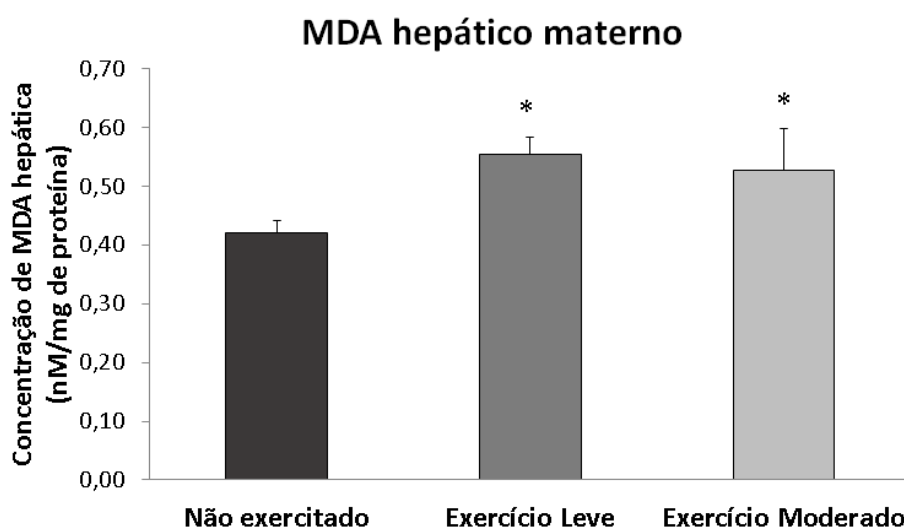


Figura 5. Concentração de malondialdeído (MDA) no fígado de mães não exercitadas e exercitadas em diferentes intensidades, $n=8$ animais/grupo.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo não exercitado (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

A Tabela 3 mostra os dados de gasometria. Foi observado aumento no pH do grupo não exercitado no dia 7 de prenhez em relação ao dia 0 de prenhez. Nos grupos exercício leve e moderado, foi notado aumento do pH sanguíneo no dia 21 de prenhez em relação ao dia 0 de prenhez. Os níveis de pCO_2 estavam diminuídos nos dias 7 e 21 de prenhez no grupo de ratas não exercitadas quando comparados com o dia 0. Nos grupos de ratas do exercício leve e moderado, o pCO_2 estava diminuído no dia 21 de prenhez em relação ao dia 0 ($p < 0,05$). Os dados de bicarbonato sanguíneo não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$). Ao fixarmos os grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados de gasometria (Tabela 3). As ratas do grupo exercício intenso não conseguiram nadar

30 minutos e apresentaram aumento do pH sanguíneo, diminuição da $p\text{CO}_2$ e do bicarbonato ao final da prenhez.

Tabela 3. Gasometria arterial (pH, pCO₂ e HCO₃) nos dias 0, 7 e 21 de prenhez de ratas não exercitadas e exercitadas nas intensidades leve e moderada.

	Basal	Não exercitado		Exercício Leve		Exercício Moderado	
	Dia 0	Dia 7	Dia 21	Dia 7	Dia 21	Dia 7	Dia 21
	(n=15)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
pH	7,24±0,06	7,41±0,07*	7,39±0,02	7,39±0,06	7,48±0,13*	7,35±0,08	7,44±0,14*
pCO₂ (mmHg)	56,58±11,27	34,57±6,73*	34,05±6,07*	37,33±5,80	24,63±7,46*	43,14±8,20	30,61±12,14*
HCO₃ (mmol/l)	24,23±3,19	21,73±1,28	20,65±2,89	23,20±0,35	20,00±0,20	23,84±1,31	21,06±5,27

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média.

*p<0,05 – comparado ao dia 0 (Basal) (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

Quanto ao desempenho reprodutivo materno, foi demonstrado que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de implantações embrionárias, número de fetos vivos (Figura 6A) e porcentagem de ratas que apresentaram perda pós-implantação embrionária maior que 10% (Figura 6B). Os resultados em relação à análise de malformações fetais externas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (dados não apresentados).

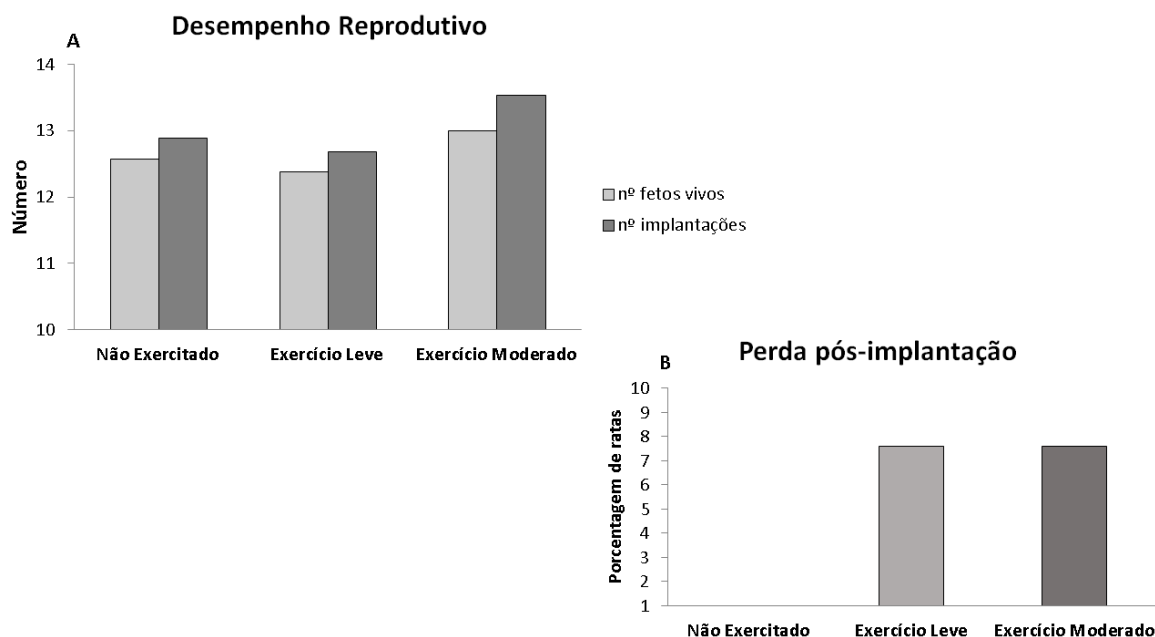


Figura 6. Desempenho reprodutivo de ratas não exercitadas e exercitadas em diferentes intensidades, n=13 animais/grupo.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

p>0,05 – sem diferença estatisticamente significativa.

A análise da classificação de peso corpóreo dos recém-nascidos foi realizada pela fixação das categorias (PIP, AIP e GIP) para comparação dos grupos. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais com relação aos recém-nascidos classificados como adequados (AIP) e pequenos (PIP) para a idade de prenhez ($p>0,05$). Podemos observar que houve diminuição na proporção de recém-nascidos classificados como grandes para a idade de prenhez (GIP) no grupo de ratas que foram submetidas ao exercício moderado em comparação ao do grupo não exercitado ($p<0,05$) (Figura 7A). Foi observado que no grupo de ratas exercitadas em intensidade intensa houve maior proporção de filhotes classificados

como pequenos para idade de prenhez (PIP). As concentrações de triglicerídeos hepáticos e adiponectina sérica dos recém-nascidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos exercício leve e moderado em relação ao grupo não exercitado ($p>0,05$) (Figura 7B e 7C, respectivamente).

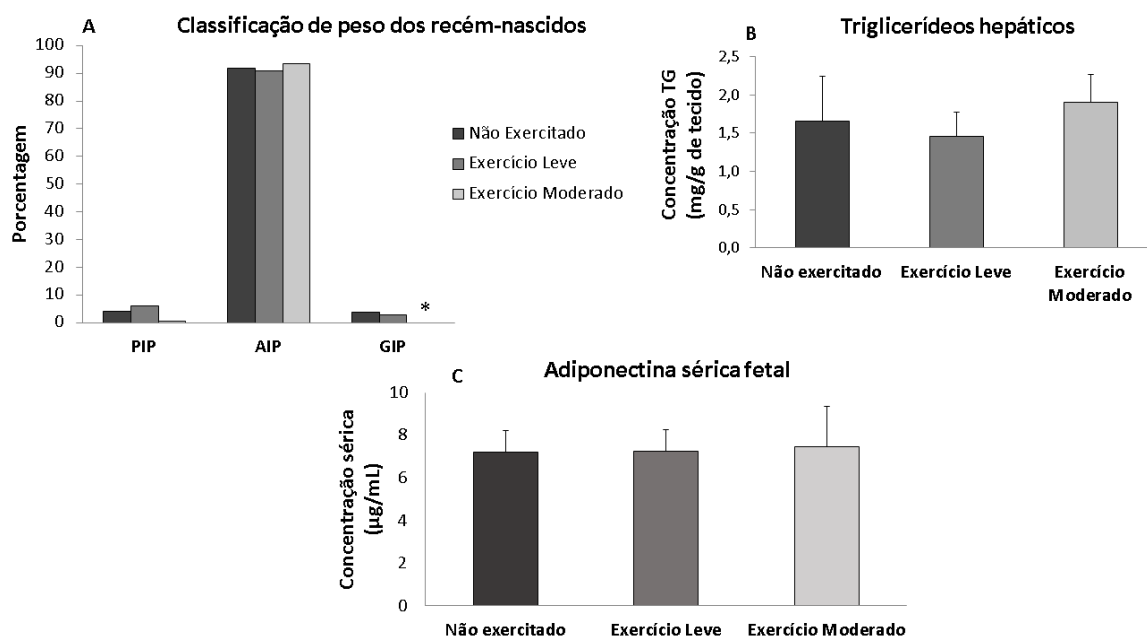


Figura 7. A. Classificação de peso dos recém-nascidos, $n=13$ mães/grupo. **B.** Concentração de triglicerídeos hepáticos dos recém-nascidos, $n=2$ RN/mãe, sendo $n=8$ mães/grupo. **C.** Concentração de adiponectina sérica dos recém-nascidos, $n=8$ pool da ninhada/grupo de mães não exercitadas e exercitadas em diferentes intensidades.

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

* $p<0,05$ – comparado ao GIP não exercitado (Teste Exato de Fisher).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado que o limiar anaeróbio das ratas prenhes foi atingido numa carga menor, entre 5,0% e 5,5% do peso corpóreo, enquanto que das não prenhes foi numa carga entre 5,5% e 6,0%. Desta forma, esses resultados mostram que esses limiares estão dentro dos encontrados na literatura para ratos *Wistar* machos (Voltarelli *et al.*, 2002). No entanto, quando foram analisadas as concentrações de lactato sanguíneo nos respectivos limiares anaeróbios das ratas, não foram encontradas diferenças entre o grupo prenhe ($9,70 \pm 2,42$ mmol/L) e não prenhe

($9,31 \pm 2,66$ mmol/L). Sugere-se que o menor limiar encontrado em ratas prenhes possa estar relacionado à ação hormonal ou atuação de enzimas como a lactato desidrogenase (LDH), que é encontrada elevada ao final da gravidez e no parto (Makkonen *et al.*, 1980). Assim, foi demonstrado que o teste do LacMin pode ser utilizado para a identificação da intensidade do exercício físico de natação em ratas prenhes e não prenhes.

Houve interesse em verificar a influência do ganho de peso corpóreo durante a prenhez das ratas em relação às cargas equivalentes ao limiar anaeróbio. Quando os testes de lactato mínimo foram realizados nos diferentes momentos da prenhez ou do experimento, foi demonstrado que o ganho de peso não interferiu nos valores das cargas observados entre os vários dias estudados. Além disso, a avaliação da pesagem hidrostática dos animais, realizada em parceria com outro laboratório, também confirmou estes achados (dados não mostrados). Isso pode ser justificado pelo fato de que o ganho de peso das ratas ocorre devido ao ganho de massa magra advinda de seus filhotes e não apenas de tecido adiposo.

Em seguida, foi observado que as ratas do grupo exercício intenso apresentaram dificuldades em nadar os 30 minutos propostos de exercício físico e que isto foi mais acentuado nos dias 7º e 8º de prenhez em função da sobrecarga excessiva aplicada de forma repentina e nos dias 18º, 19º e 20º devido às cargas impostas de acordo com a progressão do ganho de peso materno.

Nosso estudo mostrou que as ratas submetidas à natação de intensidade leve e moderada ganharam peso progressivamente durante a prenhez, mas apresentaram médias de ganho de peso menores em relação ao grupo não exercitado. As avaliações dos consumos de água e de ração desses animais não apresentaram diferenças entre os grupos (dados não mostrados). O *American College of Obstetricians and Gynecologists* - ACOG (2014) aponta que a prática regular de exercício físico durante a gestação apresenta benefícios no controle do ganho de peso materno, principalmente quando o aporte nutricional é adequado.

De maneira similar, as ratas do grupo exercício intenso apresentaram menor ganho de peso no decorrer da prenhez, mas também foi verificada maior porcentagem de fetos classificados como pequenos para idade de prenhez (PIP). Estes achados poderiam estar relacionados à maior necessidade materna de aporte energético para a

prática do exercício físico extenuante, ao mesmo tempo em que há maior necessidade de aporte de nutrientes e de oxigenação para o feto, podendo ocorrer uma disputa entre mãe e filho no momento crucial do crescimento fetal, levando como consequência alterações no seu crescimento.

A determinação da atividade da enzima creatina quinase (CK) encontrada no soro ou plasma é útil para avaliação de danos musculares decorrentes da prática do exercício físico (Foschini *et al.*, 2007). Nossos resultados mostram que não houve diferença nas atividades de CK entre os grupos não exercitados, exercício leve e moderado. Assim, sugerimos que as intensidades de exercício leve e moderada aplicadas para essa população de ratas foram adequadas. Com relação à natação de intensidade intensa, foi verificado que, mesmo as ratas que não conseguiram praticar o exercício físico por 30 minutos, apresentaram as atividades de CK plasmáticas altas, mostrando que houve danos musculares nestes animais. De acordo com Baptistella (2009), a CK é denominada enzima de extravasamento, por ser liberada das células musculares em caso de lesão. De acordo com Katirji e Jaber (2001) e Gleeson (2002), em exercício físico prolongado e extenuante, há o aumento nos níveis de CK, sendo que a magnitude dessa elevação está diretamente relacionada à intensidade e duração do exercício físico.

Em nosso trabalho, a ausência do aumento do lactato no sangue nas ratas submetidas à natação de intensidades leve e moderada poderia ser justificada pelo aumento da capacidade de remoção de lactato, que ocorre durante o exercício decorrente de um efeito benéfico do treinamento (Donovan e Brooks, 1983). As ratas do grupo exercício intenso não apresentaram aumento nos níveis de lactato sanguíneo, o que pode estar relacionado ao fato de que estas ratas não nadaram o tempo total de 30 minutos proposto para o trabalho e os efeitos do treinamento neste curto tempo não foram suficientes para elevar estas concentrações. Brooks (1985) sugere que o aumento exponencial do lactato sanguíneo, que ocorre em uma determinada intensidade submáxima de esforço, pode refletir um aumento exponencial da liberação de lactato pelo músculo e/ou uma diminuição da capacidade de remoção de lactato.

Com relação à atividade da enzima citrato sintase, não foram encontradas diferenças entre os grupos não exercitado e exercitados leve e moderado. Diversos

estudos têm utilizado a atividade de enzimas mitocondriais para analisar a influência do exercício físico na adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos (Silva *et al.*, 1997; Bexfield *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013). Alguns autores observaram aumento da atividade da citrato sintase no exercício de natação (Silva *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 1988) e no exercício de esteira (Powers *et al.*, 1994; Bexfield *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013). Porém, estes resultados não corroboram os nossos achados. Foi visto na literatura que o aumento da atividade da enzima citrato sintase tem correlação com a intensidade (Bexfield *et al.*, 2009) ou duração do exercício físico aplicado (Powers *et al.*, 1994), sugerimos que, no nosso trabalho, o curto período de prática de natação durante a prenhez das ratas foi insuficiente para apresentar alterações na atividade desta enzima.

Com interesse em estudar o metabolismo da glicose em ratas prenhes exercitadas, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Após 60 minutos do teste, as ratas do grupo exercício moderado apresentaram glicemias equivalentes à do tempo 0 (jejum), ou seja, o retorno da concentração de glicose sanguínea a valores basais ocorreu antes do término do teste, mostrando um efeito benéfico do exercício físico de natação de intensidade moderada com relação à maior captação de glicose pelos tecidos periféricos. Essa hipótese é confirmada pelos dados de insulina que não diferiram entre as ratas submetidas ou não ao exercício físico. Durante o período gestacional, ocorrem várias alterações metabólicas no organismo materno, uma delas é o aumento progressivo na produção de insulina, com aumento de sua degradação e queda de sua ação. Essas modificações produzem condições ideais para o aparecimento da resistência periférica à insulina e ao desenvolvimento do *Diabetes mellitus* gestacional (Zúñiga-González, 1998). Há evidências de que o treinamento físico melhora a sensibilidade à insulina (Hughes *et al.*, 1993, Luciano *et al.*, 2002), visto que aumenta a expressão do RNAm do receptor de insulina e do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) (Hughes *et al.*, 1993, Dugaard *et al.*, 2000), aumenta a expressão do RNAm e atividade da glicogênio sintase (Dela *et al.*, 1995) e aumenta a expressão do RNAm do receptor de insulina IRS-1 no músculo esquelético de ratos treinados em esteira (Kim *et al.*, 1999). Sendo assim, a maior captação de glicose no TOTG de ratas exercitadas moderadamente poderia estar relacionada ao aumento da

sensibilidade à insulina e/ou captação de glicose através de vias não relacionadas à insulina (Ren *et al.*, 1994; Hawley e Lessard, 2008; Kawanara *et al.*, 2000).

Com relação ao quadro de estresse oxidativo no sangue de ratas exercitadas ou não, não foram observadas diferenças. Já na avaliação da presença de lipoperoxidação no fígado desses animais, foi observado aumento na concentração de malondialdeído (MDA) nos grupos exercitados leve e moderado, corroborando com Turgut *et al.* (2003). A literatura aponta que, durante a prática de exercício físico, há aumento de espécies reativas ao oxigênio e para proteger os órgãos e tecidos de danos, as enzimas antioxidantes respondem de maneira adaptativa, elevando suas atividades (Reddy Avula e Fernandes, 1999; Jenkins, 1988; Pereira *et al.*, 1996). Estudos com exercício físico na intensidade do limiar anaeróbio aplicado a ratos durante corrida em esteira (Prada *et al.*, 2003b) ou durante exercício de natação (Prada *et al.*, 2004) apresentaram resultados de aumento nos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) circulantes nos animais treinados. Esses resultados indicam que o treinamento físico realizado na intensidade no limiar anaeróbio favoreceu o aparecimento de estresse oxidativo nesses animais. Também foi observado na literatura que o aumento na lipoperoxidação é tecido específico, pois foi constatada redução da mesma nos rins e aumento no fígado de camundongos treinados por corrida em esteira (Reddy Avula e Fernandes, 1999). Desta forma, isto poderia justificar nossos achados, pois foi encontrado aumento nos níveis de MDA no fígado dos animais estudados em diferentes intensidades de exercício físico, mas não houve alteração no sangue. Além disso, o aumento de lipoperoxidação hepática não foi suficiente para alterar o metabolismo da rata mãe, confirmado pelos dados de estresse oxidativo não existentes no sangue materno. A literatura mostra que não há consenso quanto aos protocolos de exercício físico com relação a estresse oxidativo em diferentes tecidos estudados.

Nossos resultados apontam aumento de pH e diminuição da pCO_2 nos grupos exercício leve e moderado, mas também no grupo não exercitado. Frente a este quadro, sugerimos que esses resultados sejam decorrentes da prenhez e não do exercício físico. A gestação por si só pode alterar o equilíbrio acidobásico, ocasionando quadros de hipocapnia e mudanças no pH (Baracho, 2014). A progesterona pode ser responsável pelo aumento da sensibilidade dos receptores do centro respiratório, de

tal modo que a $p\text{CO}_2$ diminui, o bicarbonato diminui e o pH aumenta ligeiramente. Essas alterações no equilíbrio acidobásico indicam que a gravidez é um estado de alcalose respiratória compensada (Gordon, 2007). Cabe ressaltar que, as ratas do grupo exercício intenso pelo fato não nadarem os 30 minutos, não apresentaram alterações na gasometria. Frente aos resultados de gasometria arterial desses animais, podemos demonstrar que esse método não definiu a intensidade para o exercício físico.

Nossos resultados mostram que a intensidade de exercício leve e moderada não causou danos em relação ao desempenho reprodutivo materno, pois foi verificado que não houve aumento da porcentagem de ratas com perda pós-implantação embrionária, nem diminuição do número de fetos vivos e não houve aparecimento de malformações fetais externas. Alguns autores apontam que a prática do exercício físico regular por si só não causa perdas embrionárias, mas a intensidade e o excesso de exercício podem prejudicar o sucesso do desempenho reprodutivo materno (Batista *et al.*, 2003). Outros autores observaram que exercício de intensidade leve a moderada em gestantes não prejudica o binômio mãe-feto (Arthal e Wiswell, 1987). A literatura aponta que, durante a gestação, o exercício físico é uma atividade segura com efeitos benéficos para mãe e o feto, mas somente se for realizado com orientação profissional e moderação, ou seja, o tipo de exercício, a frequência semanal, o período de cada sessão e a intensidade devem ser muito bem controlados nesses pacientes (Prada *et al.*, 2003a). Em relação aos estudos com animais de experimentação, os resultados ainda são conflitantes devido à variabilidade de espécies e protocolos experimentais utilizados. Há evidências que ratas praticantes de exercício físico durante a prenhez não apresentam redução no número de fetos (Parizkova, 1978), peso ao nascimento, número de filhotes por ninhada e o peso da ninhada é inalterado (Mottola *et al.*, 1986). Outros autores observaram que a prática de exercício físico materno de natação (Faridy *et al.*, 1989) e em esteira (Piçarro *et al.*, 1991; Denadai *et al.*, 1994) causou diminuição no número de filhotes. Cabe ressaltar que, nestes estudos, não há relatos sobre a intensidade de exercício físico praticada.

Foi observada manutenção dos recém-nascidos classificados como adequados para a idade de prenhez (AIP) e diminuição de recém-nascidos classificados como grandes para a idade de prenhez (GIP) no grupo de ratas submetidas à natação de

intensidade moderada. Fato que corrobora dados da literatura que mostram que o exercício regular durante a gestação reduz de 23-28% o nascimento de crianças com excesso de peso (Owe *et al.*, 2009). O ambiente materno é decisivo para o crescimento e o desenvolvimento fetal, podendo influenciá-los positiva ou negativamente. Os termos crescimento e desenvolvimento referem-se às mudanças que ocorrem no complexo fisiológico durante a concepção, embriogênese e toda a vida fetal. Estudos em humanos mostram que o exercício durante a gestação pode estar associado à redução (Bell *et al.*, 1995; Dwarkanath *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2010) ou aumento (Clapp *et al.*, 2000b; Owe *et al.*, 2009) do peso dos filhos ao nascimento. No grupo exercício intenso foi observada maior proporção de filhotes classificados como PIP. Este achado também foi encontrado na literatura, visto que filhos de mães exercitadas de forma extenuante apresentam menor peso corpóreo (Piçarro *et al.*, 1991; Denadai *et al.*, 1994).

A literatura mostra que a concentração plasmática de adiponectina apresenta-se menor em obesos e que há correlação negativa entre adiponectina e massa corporal tanto em humanos quanto em animais (Ouchi *et al.*, 2003). Nossos resultados mostram que os níveis de adiponectina fetais não diferiram entre os grupos não exercitado e exercício leve e moderado, mostrando que essas intensidades de exercício físico não influenciaram no peso corpóreo dos recém-nascidos. Outra explicação seria o pouco desenvolvimento do tecido adiposo dos recém-nascidos, que justificaria os resultados inalterados encontrados.

Com relação às determinações de triglicerídeos hepáticos fetais, não houve diferenças entre os grupos exercitados ou não exercitado, sugerindo que o exercício físico também não influenciou nesse parâmetro. A macrosomia fetal pode ser avaliada pelo acúmulo do depósito de gordura no fígado dos recém-nascidos de ratos (L'opez-Soldado e Herrera, 2003). Fato que difere do organismo humano, visto que no rato não há tecido adiposo durante o seu crescimento, pois eles têm apenas três dias para crescer intrauterino. Desta forma, o feto armazena triglicerídeos no fígado como em um depósito energético (Herrera e Amusquivar, 2000). Sendo assim, as intensidades de exercício físico não alteraram o armazenamento de triglicerídeos nesses recém-nascidos, não alterando seu crescimento. Associado ao fato de que o exercício físico de intensidade moderada diminuiu a porcentagem de filhotes

classificados como grandes para idade de prenhez (GIP), sugerimos que esse tipo de exercício preveniu a macrosomia fetal.

CONCLUSÃO

Portanto, nosso estudo permite concluir que o teste de lactato mínimo foi eficaz para avaliação da intensidade de exercício físico em ratas prenhes e não prenhes. Dentre os diversos parâmetros analisados neste estudo, o teste oral de tolerância à glicose aplicado a ratas prenhes possibilitou afirmar que o exercício físico de intensidade moderada causou efeito benéfico na captação de glicose, confirmado pelos níveis de insulina normais, ou seja, esse achado pode estar relacionado ao aumento da sensibilidade à insulina decorrente do efeito do exercício físico. Além disso, a natação de intensidade moderada não causou danos musculares, não elevou lactato sanguíneo e estresse oxidativo sanguíneo e causou benefício no desenvolvimento fetal, confirmado pela redução da porcentagem de filhotes classificados como grandes para idade de prenhez (GIP). Portanto, estes achados confirmam que a natação de intensidade moderada foi a mais eficaz e deveria ser aplicada a ratas prenhes que não apresentem nenhum tipo de complicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) por todo apoio durante a pesquisa; à Talísia Collachiti Moretto, assistente de suporte acadêmico, pelo auxílio técnico e cuidados com os animais; aos funcionários Danilo Chaguri e Carlos Roberto Gonçalves Lima por todo auxílio técnico; ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP), especialmente ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente pela contribuição no delineamento do estudo e análise estatística; ao Dr. Carlos Eduardo Meirelles Santos que não mediu esforços para criar e elaborar nosso aparelho anestésico e nosso novo tanque de natação; aos Professores Dr. Cláudio Alexandre Gobatto e Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto pelas discussões sobre o teste do lactato mínimo; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa (Processo FAPESP 2012/25168-9); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico_CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse na autoria e publicação deste manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Committee on Obstetric. Exercise during pregnancy and the postpartum period. Practice nº 267. Am Col Obstet Gynecol. 2014;99:171-3.
- ACSM. Guidelines for exercise testing and prescription. 6ª Ed. Philadelphia: Lippincott. Williams , Wilkins, 2010.
- Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochem J. 1976 Mar 15;154(3):689-700.
- Araújo MB, Prada FJA, Mello MAR. Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. 2006 Sep;12(3):307-12.
- Arthal R, Wiswell RA. Exercícios na gravidez. São Paulo: Manole; 1987.
- Baptistella MF. Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatino quinase e lactato desidrogenase em equínos submetidos a diferentes intensidades de exercícios. Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente. 2009;12(13).
- Baracho E. Fisioterapia aplicada à saúde da mulher. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
- Barros TLN, César MC, Tebexreni AS. Fisiologia do exercício. São Paulo: Atheneu; 1999.
- Basset DRJ , Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. Med Sci Sports Exerc. 2000 Jan;32(1):70-84.
- Bates A, Hanson N. Os princípios e propriedades da água. São Paulo: Manole; 1998.
- Batista DC, Chiara VL, Gugelmin AS, Martins PD. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2003;3(2):151-8.
- Bell R. The effects of vigorous exercise during pregnancy on birth weight. J Sci Med Sport. 2002 Mar;5(1): 32-6.
- Bell RJ, Palma SM, Lumley JM. The effect of vigorous exercise during pregnancy on birth weight. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 1995 Feb;35(1):46-51.
- Bennell K. The female athlete. 2ª Ed. Austrália: McGraw-Hill; 2001.
- Bexfield NA, Parcell AC, Nelson WB, Foote KM, Mack GW. Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. J Appl Physiol (1985). 2009 Sep;107(3):749-54.
- Brooks GA. Anaerobic threshold: a review of the concept and directions for future research. Med Sci Sports Exerc. 1985 Feb;17(1):22-34.
- Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. J Sports Sci 1997 Apr;15(2):215-22.
- Clapp JF 3rd. Exercise during pregnancy. A clinical update. Clin Sports Med. 2000a Apr; 19(2):273-86.
- Clapp JF 3rd, Kim H, Burciu B, Lopez B. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. Am J Obstet Gynecol. 2000b Dec;183(6):1484-8.
- Close GL, Kayani A, Vasilaki A, McArdle A. Skeletal muscle damage with exercise and aging. Sports Med 2005;35(5):413-27.
- Damasceno DC, Silva HP, Vaz GF, Vasques-Silva FA, Calderon IM, Rudge MV, Campos KE, Volpato GT. Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies. Reprod Sci. 2013 Jul;20(7):730-8. doi: 10.1177/1933719112461186. Epub 2012 Nov 21.
- Damasceno DC, Kempinas WDG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, Paumgartten FJR. Anomalias congênitas - estudos experimentais. Botucatu: Editora Médica; 2008.
- Damasceno DC, Volpato GT, Mattos IMP, Rudge MVC. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. Anim Reprod Sci. 2002 Aug 15;72(3-4):235-44.
- Daugaard JR, Nielsen JN, Kristiansen S, Andersen JL, Hargreaves M, Richter EA. Fiber typespecific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: Influence of exercise training. Diabetes. 2000 Jul;49(7):1092-5.
- de Souza Mda S, Sinzato YK, Lima PH, Calderon IM, Rudge MV, Damasceno DC. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. Reprod Biomed Online. 2010; 20(4):547-52.
- Dela F, Larsen JJ, Mikines K, Ploug T, Petersen LN, Galbo H. Insulin-stimulated muscle glucose clearance in patients with NIDDM. Effects of one-legged physical training. Diabetes. 1995 Sep;44(9):1010-20.
- Denadai BS, Piçarro Ida C, Madjian S, Bergamaschi CT, Santos VC, da Silva AC, Russo AK. High intensity exercise during pregnancy of rats. Effects on mother and offspring. Comp Biochem Physiol A Physiol. 1994 Nov;109(3):727-40.
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. J Clin Invest. 2003 Oct;112(7):1049-57.
- Dwarkanath P, Muthayya S, Vaz M, Thomas T, Mhaskar A, Mhaskar R, Thomas A, Bhat S, Kurpad A. The relationship between maternal physical activity during pregnancy and birth weight. Asia Pac J Clin Nutr. 2007;16(4):704-10.
- Faridy EE, Sanii MR, Thliveris JÁ. Fetal lung growth: influence of maternal exposure to cold and exercise in rats. Respir Physiol. 1989 Mar;75(3):309-25.
- Foschini D, Prestes J, Charro MA. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum. 2007;9(1):101-6.
- Gleeson M. Biochemical and immunological markers of over-training. J Sports Sci Med. 2002 Jun 1;1(2):31-41.

- Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyou PM, Horton ES. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes*. 1992;41(9):1091-9.
- Gordon M. *Maternal physiology*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2007.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3^a Ed. New York: Oxford, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Oxidative Stress: adaptation, damage, repair and death*. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol*. 2008 Jan;192(1):127-35.
- Herrera E, Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000 May;16(3):202-10.
- Heunks LM, Viña J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277:1697-704.
- Hopkins SA, Baldi JC, Cutfield WS, McCowan L, Hofman PL. Exercise training in pregnancy reduces offspring size without changes in maternal insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May;95(5):2080-8.
- Hughes VA, Fiatarone MA, Fielding RA, et al. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Physiol*. 1993 Jun;264(6Pt1):E855-62.
- Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;8;2(1):37.
- Jenkins RR. Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988 Mar;5(3):156-70.
- Katirji B, Al-Jaberi MM. Creatine kinase revisited. *J Clin Neuromusc Dis*. 2001;2(3):158-63.
- Kim Y, Inoue T, Nakajima R, Shirai-Morishita Y, Tokuyama K, Suzuki M. Effect of long-term exercise on gene expression of insulin signaling pathway intermediates in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jan 27;254(3):720-7.
- Kinderman W, Simon G, Keul J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1979 Sep;42(1):25-34.
- Krasevec JA, Grimes DC. *Pregnancy: before, during and after*. Champaign: Leisure Press. 1985.
- L'opez-Soldado LI, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of Streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res*. 2003 Apr;4(2):107-18.
- Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CRO, Carnevali JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*. 2002 Jul;147(1):149-57.
- Makkonen M, Penttilä IM, Castrén O. Serum lactic acid dehydrogenase and isoenzymes during pregnancy and labor. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1980;59(2):97-102.
- Manchado FB, Gobatto CA, Voltarelli FA, Mello MAR. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2006 Dec;31(6):731-6.
- Mastrocolla LE, Mastrocolla HB, Andrade J. *Atividade física na gravidez - riscos x benefícios*. Boletim do Departamento de Cardiopatía e Gravidez da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2000.
- Melin B, Bourdon L, Jimenez C, Charpenet A, Bernard O. Plasma myosin and creatine kinase time-course after a concentric-eccentric field exercise. *Arch Physiol Biochem*. 1997 Feb;105(1):27-31.
- Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, Wisløff U, Brum PC. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol*. 2013 Apr;114(8):1029-41.
- Mottola MF, Bagnall KM, Belcastro AN, Foster J, Secord D. The effects of strenuous maternal exercise during gestation on maternal body components in rats. *J Anat*. 1986 Oct;148:65-75.
- Nosaka K, Newton M. Repeated eccentric bouts do not exacerbate muscle damage and repair. *J Strength Cond Res*. 2002 Feb;16(1):117-22.
- Nosaka K, Newton M, Sacco P, Chapman, D, Lavender A. Partial protection against muscle damage by eccentric actions at short muscle lengths. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 May 37(5):746-53.
- Osorio RA, Christofania JS, D'Almeida V, Russo AK, Piçarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003 May;135(1):89-95.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Dec;14(6):561-6.
- Owe KM, Nystad W, Bø K. Association between regular exercise and excessive newborn birth weight. *Obstet Gynecol*. 2009 Oct;114(4):770-6.
- Parizkova J. The impact of daily work load during pregnancy and/or postnatal life on the heart microstructure of rat male offspring. *Basic Res Cardiol*. 1978 Sep;73(5):433-41.
- Pereira B, Costa Rosa LFPB, Bechara EJH, Curi R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. *Cienc Cult*. 1996;48(1-2):43-6.
- Piçarro IC, Barros Neto TL, De Teves DC, Silva AC, Denadai DS, Tarasantchi J, Russo AK. Effect of exercise during pregnancy, graded as a percentage of aerobic capacity: maternal and fetal responses of the rat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1991;100(4):795-9.

- Poprzęcki S, Staszkiwicz A, Hübner-Woźniak E. Effect of eccentric and concentric exercise on plasma creatine kinase (ck) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in healthy adults. *Biology of Sport*. 2004;21(2):193-203.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1994 Feb;266(2Pt2):R375-80.
- Powers SK, Howley ET. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. Manole: São Paulo, 2000.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production *Physiol Ver*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
- Prada ACB, de Mello MAR. Modulação pelo exercício físico da ação periférica da insulina durante a prenhez em ratas. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*. 2003a;2(2):85-99.
- Prada FJA, Macedo DV, Mello MAR. Indicadores metabólicos e estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento por corrida em esteira rolante em velocidade equivalente à máxima fase estável de lactato. *R Bras Ci Mov*. 2003b;240-240.
- Prada FJA, Voltarelli FA, Macedo DV, Mello MAR. Indicadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento em natação. *Rev Port Ci Desporto*. 2004;4(2):237-74.
- Reddy Avula RCP, Fernandes G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milano)*. 1999 Aug;11(4):246-52.
- Rowlands DS, Downey B. *Physiology of triathlon*. Philadelphia: Lippincott Williams, Wilkins; 2000.
- Silva GJJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;2(30):714-9.
- Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon IMP, Rudge MV, Damasceno DC. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res*. 2012;1-7. 2012:108163. doi: 10.1155/2012/108163. Epub 2012 Jun 20.
- Turgut G, Demir S, Genç O, Karabulut I, Akalin N. The effect of swimming exercise on lipid peroxidation in the rat brain, liver and heart. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 2003;27(2-3):43-5.
- Vieira R, Haebisch H, Kokubun E, Hell NS, Curi R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. *Arquivo de Biologia e Tecnologia*. 1988;31(3):387-94.
- Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato YK, Ribeiro VM, Rudge MV, Calderon IM. Oxidative stress status and placental implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. *Reprod Sci*. 2015 May;22(5):602-8. doi: 10.1177/1933719114556485. Epub 2014 Oct 30.
- Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Nov; 35(11):1389-94.
- Wasserman K, Mcilroy MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am J Cardiol*. 1964 Dec;14: 844-52.
- Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*. 1973 Aug;35(2):236-43.
- Zúñiga-González SA. Diabetes and pregnancy. *Ginecol Obstet Mex*. 1998 Jun;66:221-6.