

## EFEITOS DO TREINAMENTO EM ESTEIRA EM RATOS ADULTOS OBESOS PROGRAMADOS PELA SUPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL

Stephan Pinheiro Frankenfeld<sup>1,2</sup>, Gustavo Casimiro-Lopes<sup>1</sup>, Gabriel Boaventura<sup>1</sup>, Ellen Paula Santos Da Conceição<sup>1</sup>, Elaine Oliveira<sup>1</sup>, Egberto Moura<sup>1</sup>, Patrícia Lisboa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Correspondência para: [pclisboa.uerj@gmail.com](mailto:pclisboa.uerj@gmail.com)

Submetido em 6 de Maio de 2016

Primeira decisão editorial em 25 de Maio de 2016

Aceito em 7 de Julho 2016

### RESUMO

A superalimentação pós-natal (EO) é um fator de risco para a obesidade e distúrbios metabólicos. Ratos criados em ninhadas pequenas podem desenvolver obesidade, hiperfagia, resistência à leptina, dislipidemia, resistência à insulina e hipertensão quando adultos. Como exercício crônico traz benefícios conhecidos para indivíduos obesos, estudamos os efeitos do treinamento em esteira em ratos obesos adultos programados pelo EO durante a lactação. OE pós natal foi induzida através da redução do tamanho da ninhada para três filhotes. Grupos com tamanho da ninhada normal (10 filhotes) foram utilizados como controle. Após o desmame, os ratos tiveram livre acesso à dieta padrão e água. Aos 75 dias de idade, ratos criados em ninhadas pequenas e normais foram divididos em (n = 7 / grupo): sedentário superalimentados (SO), treinados superalimentados (TO), controle sedentário (SC) e controle treinado (TC). Um teste de velocidade máxima foi realizada em todos os ratos para estabelecer os parâmetros de treinamento de velocidade e intensidade. O treinamento físico começou aos 90 dias de idade até 180 dias de idade, para o grupo TO e o grupo TC (60min / dia, 5 dias / semana, 65% do teste de velocidade máxima). Aos 180 dias de idade, todos os grupos foram sacrificados para coleta de sangue e tecido. O treinamento físico foi capaz de reduzir corticosteronemia e leptinemia em ratos superalimentados e controles (TO e TC). No entanto, trigliceridemia só foi reduzida em controles (TC). Os animais do grupo TO apresentaram menor peso corporal, adiposidade, ingestão de alimentos e pressão arterial sistólica. No entanto, eles apresentaram teores de proteína e soro HDLc mais elevados, sugerindo uma melhora em parâmetros associados à síndrome metabólica causada pela superalimentação durante a lactação. Como conclusão, observamos que o treinamento físico de baixa intensidade atenuou algumas alterações

metabólicas e hormonais de ratos machos adultos programados pela superalimentação neonatal, demonstrando ser um recurso importante no combate a doenças cardiovasculares e metabólicas.

**Palavras-chave:** Superalimentação; plasticidade do desenvolvimento; Obesidade; Treinamento físico.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, em resposta ao balanço energético positivo e é geralmente associada a muitas doenças [1]. Vários fatores podem levar à obesidade, tais como mudanças no comportamento alimentar e metabolismo energético, sedentarismo, influências genéticas e ambientais, bem como as condições psicossociais e neurológicas [2].

Vários estudos têm mostrado que as mudanças no perfil nutricional e hormonal no início da vida pode causar mudanças no imprint epigenético e pode programar para mudanças permanentes ou de longo prazo na estrutura ou função do organismo [3-5]. Hoje em dia, a "programação" foi renomeado como "plasticidade do desenvolvimento", devido a ser mais probabilística do que determinista e pode apresentar mais alterações durante o desenvolvimento [6].

Superalimentação Pós-natal (EO) pode ser induzida por redução do tamanho da ninhada, que é um modelo experimental adequado para estudar as consequências a curto e longo prazo da obesidade causada por superalimentação neonatal. Animais criados em ninhadas pequenas desenvolvem hiperfagia, resistência à leptina, obesidade visceral, hipertensão, HDL-c na vida adulta, que são bem conhecidos como componentes da síndrome metabólica e associado com alto risco de doença cardiovascular [7-11].

As alterações metabólicas induzidas pela programação, que foram citadas anteriormente, podem ser agravadas pelo comportamento sedentário, e influenciar diretamente na capacidade física, como foi observado em animais submetidos à restrição de prolactina materna durante a lactação (modelo de programação induzido pelo desmame precoce), que apresenta um fenótipo compatível com o da síndrome metabólica [12].

Em um estudo posterior no modelo de desmame precoce, observou-se que o treinamento físico na roda de corrida motorizada, poderia exercer adaptações positivas contendo este perfil deletério. No entanto, este método apresenta algumas limitações estruturais, podendo necessitar de aumento na intensidade de treinamento [13].

O treinamento em esteira é um modelo mais conhecido de exercício e uma vez que os dois modelos de programação (supernutrição precoce e desmame precoce) produzem padrão semelhante de componentes da síndrome metabólica, a hipótese é de que o exercício de baixa intensidade poderia amenizar esses efeitos deletérios programados em animais TO.

Assim, foi avaliada em um modelo de rato de EO pós-natal, se o treinamento físico pode reverter alguns dos distúrbios endócrinos / metabólicas observadas neste modelo de programação usando o treinamento físico em esteira com base no teste de velocidade máxima individual.

## **MÉTODOS**

### ***Animais e delineamento experimental.***

Nosso projeto experimental foi aprovado pelo Comitê de Cuidado e Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (CEUA / 014/2009). O cuidado e manejo dos animais experimentais seguiu os princípios adotados no Brasil de acordo com a Lei brasileira no. 11.794 / 2.008. Os experimentos foram realizados para minimizar o número de ratos e o sofrimento, seguindo a doutrina ética - redução, refinamento e substituição.

Ratos Wistar foram alojados em um biotério com temperatura controlada (23-25 °C), com 12 h de luz: ciclo escuro (07h00 - 19:00). Ratas adultas foram alojadas com ratos do sexo masculino (3: 1). Durante a gravidez e lactação, as mães foram alojadas em gaiolas individuais contendo água ad libitum e dieta padrão (Purina, Paraná, Brasil). Para induzir EO, o tamanho da ninhada foi ajustado para 3 filhotes machos por cada ninhada (Ninhada pequena) com 3 dias de idade [14]. As ninhadas contendo 10 filhotes por mãe serviu como controle (Ninhada normal) [10]. Após o desmame, os ratos tiveram livre acesso à dieta padrão e água (3 ratos por gaiola). Ganho de peso corporal e ingestão de alimentos foi medida e controlada a partir do dia 21 pós-natal (PN) ao dia 180 (dados não apresentados). Os resultados apresentados neste trabalho estão relacionados com a última medição do peso corporal e da ingestão alimentar. No presente estudo, 14 ninhadas diferentes (pequena, n = 7 e normais, n = 7) foram usados e nós distribuídos aleatoriamente 2 animais em cada grupo (14 ratos superalimentados e 14 ratos controle).

### ***Teste de velocidade máxima.***

Este teste foi aplicado para avaliar a velocidade máxima do exercício na esteira em todos os animais, garantindo a prescrição da intensidade do exercício individualizado. Aos 75 dias de idade, os ratos de pequenas ninhadas (superalimentados) e normal (controle) foram submetidos a um período de corrida de aclimação durante 2 a 3 dias na esteira (10 min / m durante 5 minutos). Após este período, os animais foram submetidos a um teste de velocidade máxima. O teste foi realizado sem inclinação, a uma velocidade de 10 min / m, um aumento de 1,2 m / min a cada 2 minutos até a exaustão. A exaustão foi caracterizado quando os ratos se recusavam a correr mesmo após a estimulação elétrica promovido pela grade na parte de trás da esteira.

### ***Protocolo de treinamento.***

Aos 90 dias de idade, os ratos foram divididos em 4 grupos (7 ratos / cada grupo): controle sedentário (SC, ratos criados em ninhadas normais), controle treinado (TC, ratos criados em ninhadas normais que foram treinados), sedentários superalimentados (SO, ratos criados em pequenas ninhadas), treinados superalimentados (TO, ratos criados em pequenas ninhadas que foram treinados). De PN 90 até 180, TC e aos grupos iniciaram as sessões de treinamento crônicas em uma esteira rolante (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), 5 dias / semana. Na 8ª semana, intensidade e volume foram fixados até ao final do treinamento, com 60 minutos de treinamento a 20 m / min, o que equivale a 65% da velocidade máxima atingida no teste de velocidade máxima na esteira. A grade de choque foi neutralizado por meio da inserção de barreiras de plástico, para reduzir o stress e os danos a pata e cauda durante os treinos.

### ***Pressão Arterial Sistólica, Procedimentos de eutanásia e coleta de sangue***

Uma semana antes do sacrifício, a pressão arterial sistólica (PAS) foi medida de forma não invasiva em ratos conscientes por pletismografia de cauda manguito (LE 5000, LETICA Scientific Instruments, Barcelona, Espanha). A primeira medida da PAS foi descartado e a média das três medidas subsequentes foi utilizada. Neste período, a glicemia foi determinada em amostras de sangue a partir da veia da cauda usando uma glucosimeter (Accu-Chek® vantagem, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Em PN 180, todos os animais foram mortos com uma dose letal de cloridrato de cetamina / cloridrato de xilazina (2: 1). O sangue foi obtido por punção cardíaca, centrifugado (1000xg a 4 °C durante 30 minutos) e o soro foi armazenado a -20 °C. Os seguintes tecidos foram recolhidos para quantificação e / ou avaliação bioquímica: fígado, supra-renal e a massa de gordura visceral.

### ***Composição Corporal***

A massa de gordura visceral (mesentérica, epididimal e tecido adiposo branco retroperitoneal) foi retirada e imediatamente pesadas para avaliação da adiposidade central. A massa de gordura e proteína foram determinadas pela metodologia de carcaça como relatado anteriormente [15]. Após o sacrifício, retirou-se as vísceras da prole; as carcaças foram pesadas, autoclavadas durante 1 h e homogeneizou-se em água destilada (1: 1 w / v). Os homogenatos foram armazenados a -20 °C para análise. Três gramas de homogenato foram usadas para determinar a massa de gordura por gravimetria. As amostras foram hidrolisadas em um banho de água (shaker) agitado a 70 °C durante 2 h com 30% de KOH e etanol (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil). ácidos graxos totais e colesterol livre foram removidos por três lavagens sucessivas com éter de petróleo (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil). Após secagem durante a noite no vácuo, os tubos foram pesados, e os dados foram expressos como gramas de gordura por 100 g de carcaça. O teor de proteína foi determinado em 1 g de homogenato. Os tubos foram centrifugados a 2000xg durante 10 min. As concentrações totais de proteína foram determinadas pelo método de Lowry et al [16]. Os resultados foram expressos como g de proteína por 100 g de carcaça.

### ***Medidas hormonais***

Todas as medições foram realizadas num ensaio único. leptina sérica foi determinada pelo kit de RIA (Linco Research, St. Charles, MO, EUA). O limite de sensibilidade e a variação intra-ensaio foram de 0,5 ng / ml e 6,9%, respectivamente. Insulina sérica foi determinada pelo kit de RIA (ICN Pharmaceuticals Inc., Orangeburg, NY, EUA) com uma sensibilidade do ensaio de 0,1 ng / ml e uma variação intra-ensaio de 4,1%. Corticosterona sérica foi avaliada utilizando um kit RIA específico comercial (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EUA) com uma sensibilidade do ensaio de 50 ng / ml e um coeficiente de variação intra-ensaio de 7%. O conteúdo total de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) foi determinada na glândula supra-renal, utilizando o método de fluorescência trihydroxyndole [17]. Glândulas adrenais foram homogeneizados em 500 µL de ácido acético a 10% e centrifugou-se a 10.000 x g durante 1 min. Para o ensaio, 50 µL dos padrões / epinefrina de sobrenadante foram misturados com 250 µL de tampão de fosfato (0,5 M, pH 7,0) e 25 µL de ferricianeto de potássio (0,5%) seguido por incubação (20 min; banho de gelo). A reação foi parada com 500 µL de ácido ascórbico / NaOH 10 N (1,19). Os parâmetros utilizados no fluorímetro (Victor2, Perkin Elmer, MA, EUA) foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. Os resultados foram obtidos através da representação gráfica dos valores como

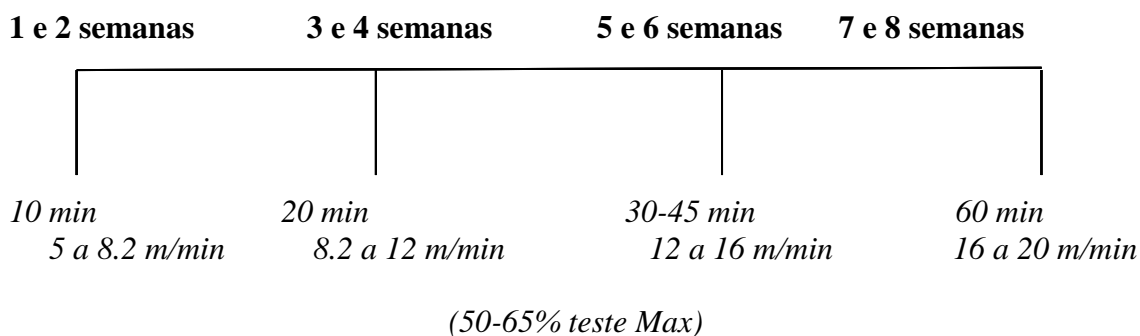
uma regressão linear da curva padrão de epinefrina. Os dados foram expressos como catecolaminas  $\mu\text{M} / \text{ml}$ .

### **Perfil lipídico**

Colesterol total (CT), triglicérides e colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) foram analisados utilizando kits de teste comercial Biosystem™ com um espectrofotômetro A15 automatizado (Biosystems S.A., Barcelona, Espanha). LDL-C e VLDL-C foi calculado de acordo com a equação de Friedewald [18].

### **Análise estatística**

Programa GraphPad Prism 5 foi usado para análise dos gráficos estatísticos (softwares Graph Pad, Inc., La Jolla, CA, EUA). Two-way ANOVA foi aplicado com pós teste de Tukey. Os dados são expressos como média  $\pm$  SE, e  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

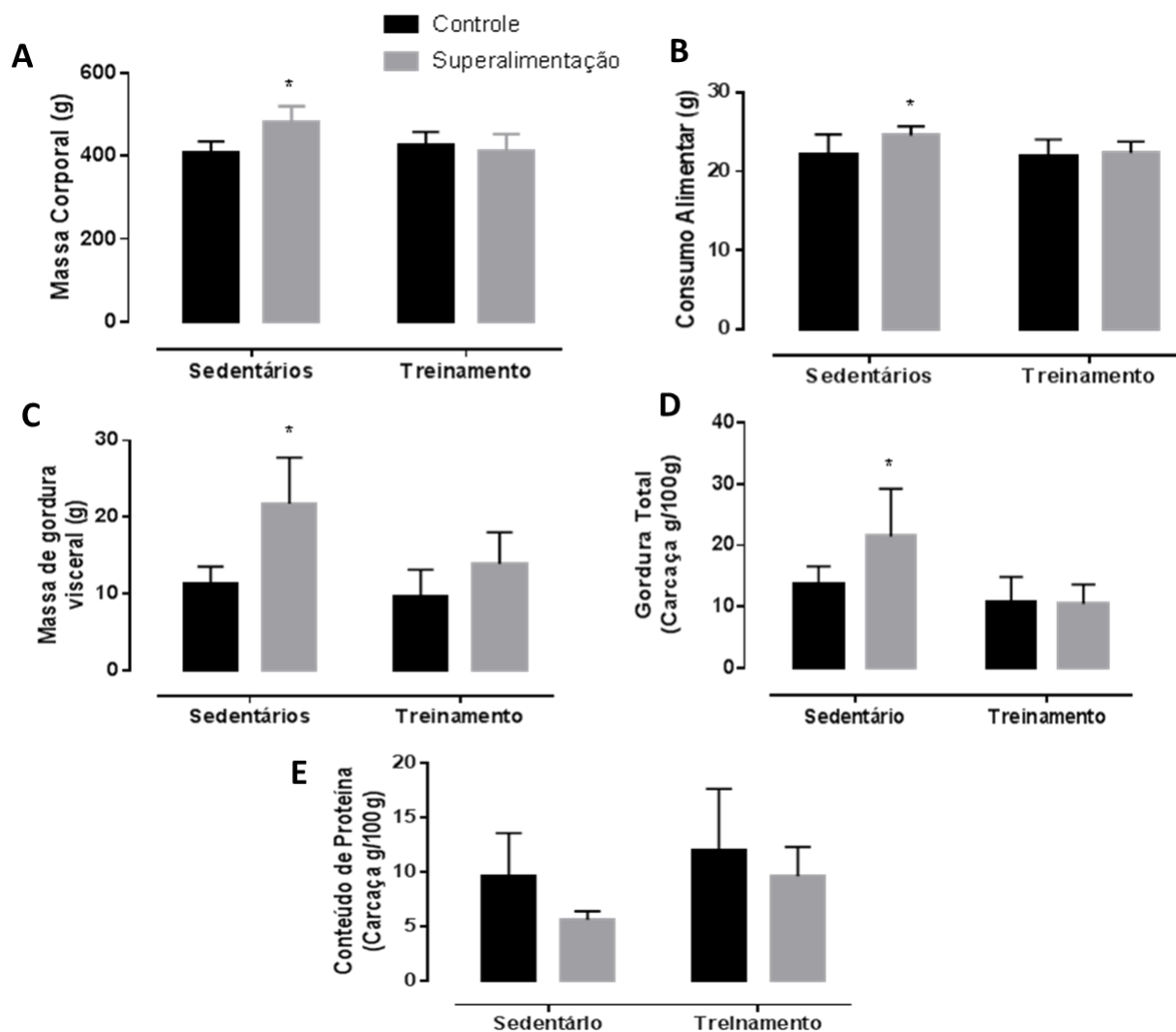


**Figura 1.** Representação esquemática do programa de treinamento físico de controle e filhotes de ratos superalimentados.

## **RESULTADOS**

Aos 75 dias de idade, não houve diferenças entre os dois grupos (superalimentados:  $34,0 \pm 3,2$  min vs controle:  $33,9 \pm 4,8$  min) no teste de velocidade máxima na esteira.

Aos 180 dias, o grupo SO apresentou maior massa corporal (Figura 2A) e hiperfagia, que foi revertida em animais superalimentados treinados (Figura 2B; -8,1%;  $p < 0,05$ ). Além disso, estes animais também apresentaram maior gordura visceral (Figura 2C; 1,5 vezes de aumento,  $p < 0,05$ ) e teor total de gordura na carcaça (Figura 2D; 95%;  $p < 0,05$ ) com mesmo teor de proteína (Figura 2E). Curiosamente, o programa de treinamento físico restaura a composição corporal em relação ao teor de gordura para um padrão semelhante, observada em SC e animais TC. Este treinamento de baixa intensidade não foi capaz de alterar esses parâmetros nos animais controle.

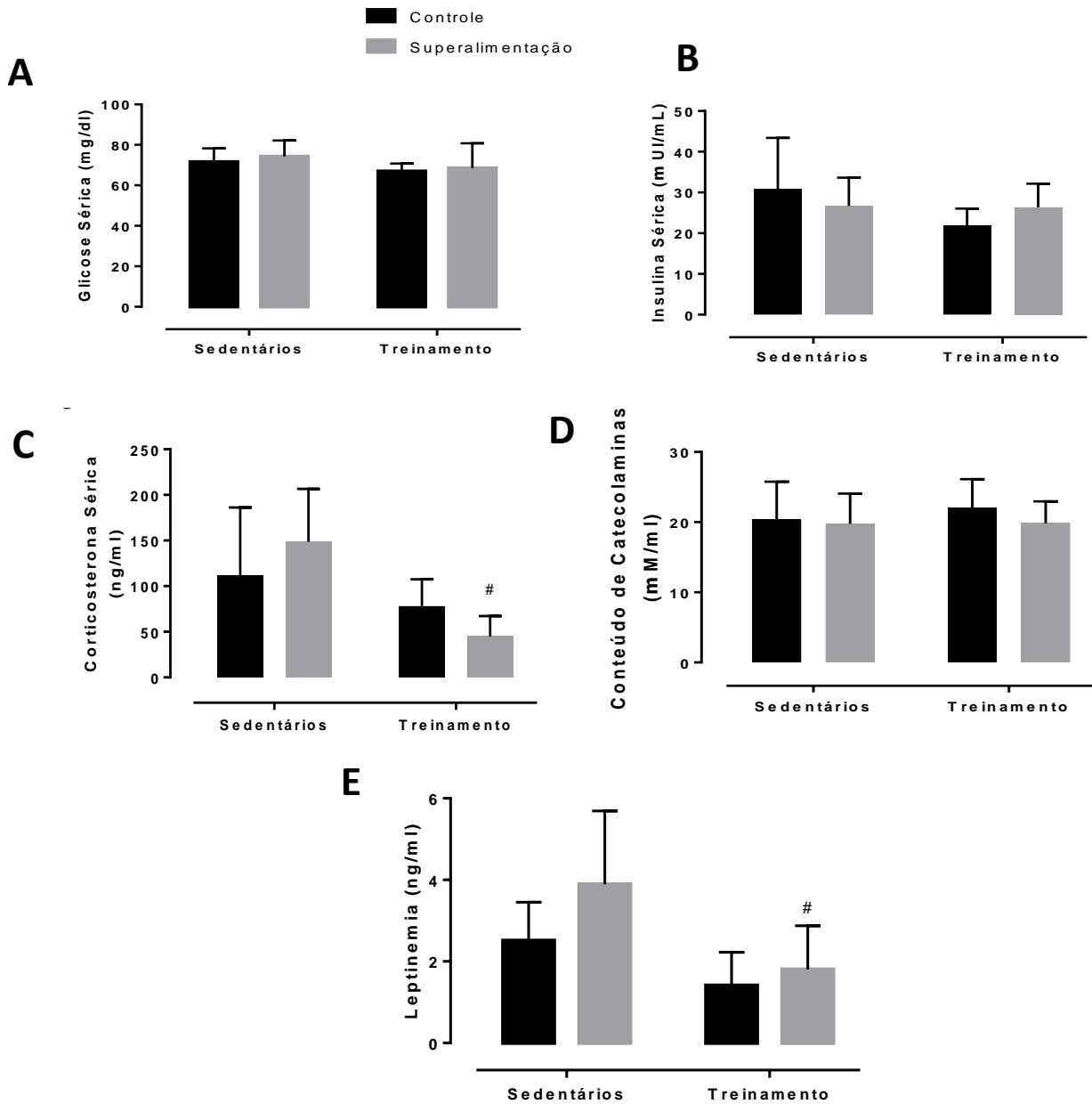


**Figura 2.** Massa Corporal (A), Consumo Alimentar (B), Gordura Visceral (C), Gordura Corporal Total (D) e Conteúdo de Proteína na Carcaça (E) de ratos controle sedentário (SC), controle treinado (TC), superalimentado sedentário (SO), superalimentado treinado (TO) aos 180 dias de vida. Valores expressos por média  $\pm$  SE. n=7 por grupo. \*p<0.05 vs SC; #p<0.05 vs SO.

A glicose no sangue e concentrações séricas de insulina não apresentaram diferenças significativas (Figuras 3A e 3B). O mesmo padrão foi observado para o teor de catecolamina na glândula supra-renal (Figura 3D). No entanto, animais superalimentados treinados (TO) mostraram menor quantidade de corticosterona que seu grupo controle (Figura 3C; -54% e -64%, respectivamente; p < 0,05) e também nos níveis de leptina (Figura 3E; -56%, respectivamente; p < 0,05).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de colesterol sérico total e LDL-c em todos os grupos (Tabela 1). O grupo TC apresentou diminuição no VLDL-C (-31%, p < 0,05) e nos triglicéridos (-32%, p < 0,05). Como esperado, o grupo

SO tem uma diminuição do HDL-c (-11%;  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CS, enquanto que no Grupo TO as concentrações séricas de HDL-c normalizaram.



**Figura 3.** Glicemia(A), insulinemia (B), corticosteronemia (C), conteúdo de catecolaminas na adrenal (D) and leptinemia (E) dos ratos controle sedentário (SC), controle treinado (TC), superalimentado sedentário (SO), superalimentado treinado (TO) aos 180 dias de vida. Valores expressos por média  $\pm$  SE.  $n=7$  por grupo. \* $p < 0.05$  vs SC; # $p < 0.05$  vs SO.

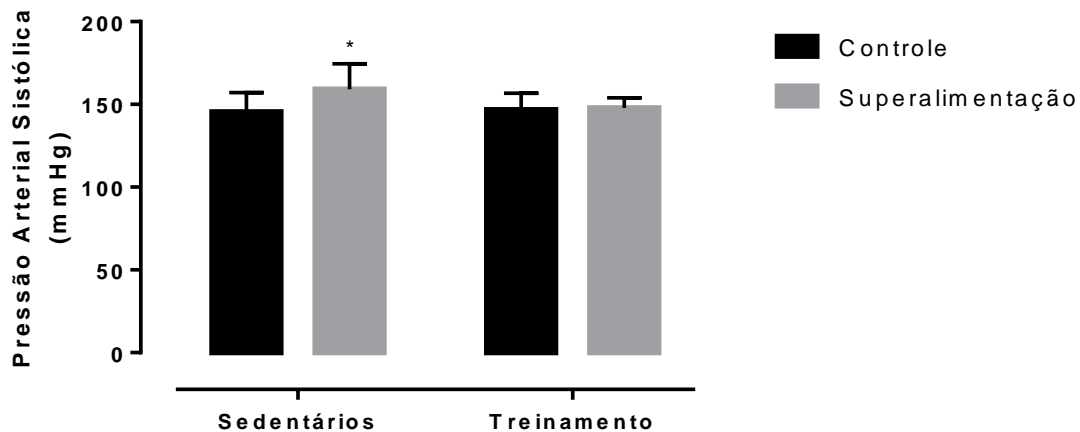
A Superalimentação pós-natal causou maior pressão arterial sistólica na vida adulta (Figura 4; + 10%;  $p < 0,05$ ) e o treinamento físico induziu a normalização desse parâmetro.

**Table 1: Perfil Lipídico de Ratos Controle e Superalimentados aos 180 dias.**

	<b>Controle Sedentário</b>	<b>Controle Treinado</b>	<b>Superalimentado Sedentário</b>	<b>Superalimentado Treinado</b>
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	77.9 ± 2.4	73.0 ± 3.1	76.9 ± 4.1	77.0 ± 3.7
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	41.8 ± 2.6	43.2 ± 3.1	41.2 ± 4.2	39.2 ± 3.4
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	22.8 ± 0.6	20.7 ± 0.7	20.2 ± 0.7 *	23.4 ± 1.7
<b>VLDL-c (mg/dl)</b>	13.9 ± 1.1	9.55 ± 0.8 #	15.0 ± 1.3	14.3 ± 0.6
<b>Triglicérides (mg/dl)</b>	69.6 ± 5.4	47.6 ± 4.2 #	74.4 ± 6.4	71.1 ± 3.0

Colesterol lipoproteico de alta densidade (HDL-c), Colesterol lipoproteico de baixa densidade(LDL-c) Colesterol lipoproteico de muito baixa densidade(VLDL-c). Valores expressos por média ± SE. n=7 por grupo. \* $p < 0.05$  vs SC; # $p < 0.05$  vs SO.





**Figura 4.** Pressão arterial sistólica de ratos dos ratos controle sedentário (SC), controle treinado (TC), superalimentado sedentário (SO), superalimentado treinado (TO) aos 180 dias de vida. Valores expressos por média  $\pm$  SE.  $n=7$  por grupo. \* $p<0.05$  vs SC; # $p<0.05$  vs SO.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, observamos que a superalimentação pós-natal, induzida pela redução do tamanho da ninhada, aumenta o peso corporal durante a lactação e durante todo o desenvolvimento. Nossos dados reforçam estudos anteriores do nosso grupo [10, 14, 19] e outros autores [11, 20]. No presente estudo, observou-se que o treinamento físico em esteira nos animais OE diminui o risco de problemas cardiovasculares através da normalização de alguns parâmetros observados nesses animais, como padrão de composição corporal, perfil lipídico e pressão arterial.

Para a prescrição de treinamento físico, foi realizado aos 75 dias de vida, um teste de velocidade máxima na esteira. Este teste tem uma correlação importante com o teste de VO<sub>2</sub> máximo e pode ser uma boa alternativa para prescrição de treinamento físico [21]. Em nosso estudo, não houve diferenças na capacidade física entre os animais controle (ratos criados em ninhadas normais) e do grupo superalimentado (ratos criados em pequenas ninhadas) nesta idade. Corroborando com esses achados, ratos Wistar com excesso de peso, alimentados com dieta rica em gordura, que foram submetidos a um teste de velocidade máxima, não apresentaram diferença na capacidade física em comparação aos animais controle [22].

A distribuição de tecido adiposo na obesidade é muito importante, uma vez que dependendo da região de deposição da gordura, aumenta o risco de doença cardiovascular [20, 23, 24] e o treinamento físico reduz a gordura corporal, dependendo da intensidade e do volume de treinamento. Nosso e estudos anteriores sugerem que a obesidade neonatal induzida pela superalimentação pós-natal pode ser um fator de risco para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica na vida adulta, principalmente porque aumenta a adiposidade visceral, pressão arterial sistólica e reduz os níveis séricos de HDLc [11, 25, 26]. Os animais SO apresentaram maior adiposidade central e total, além de massa de proteína menor, corroborando com estudos anteriores do nosso grupo [14, 19, 26, 27]. O efeito do exercício físico sobre peso corporal e / ou massa gorda é corroborado por vários estudos independentes [28-33]. Neste estudo foram

avaliados efeitos do treinamento crônico em esteira na composição corporal por meio da análise de carcaça e da extração de massa de gordura visceral, demonstrando que o exercício físico foi capaz de reverter o padrão de composição corporal prejudicial, promovido pela superalimentação, com estes animais mostrando valores normalizados para os indicadores de gordura (visceral gorduras e total) e conteúdo de proteína total na carcaça.

A Programação e o treinamento físico não foram capazes de alterar a trigliceridemia, glicemia, insulinemia e conteúdo catecolaminas adrenal. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de reduzir corticosterona no soro dos grupos TC e TO em proporção semelhante, o que corrobora com um estudo onde animais que foram submetidos a choques elétricos de baixa tensão (onde se aumentava rapidamente a corticosterona sérica do animal) e imediatamente tiveram acesso por 3 horas a uma roda de atividade (alto volume de exercício físico), também apresentaram, após a atividade uma menor quantidade de corticosterona no plasma [34, 35]. Os resultados do presente estudo estão de acordo com estudos anteriores que mostram o efeito da redução do treinamento físico crônico sobre os níveis de corticosterona [13, 36, 37]. A menor adiposidade visceral encontrada no grupo TO pode contribuir para a uma menor corticosteronemia, uma vez que esta também é produzida pela conversão de 11-desidrocorticosterona por 11- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) em roedores [46, 47, 48]. No entanto, o treinamento também diminuiu os níveis séricos de corticosterona nos controles, sem qualquer alteração na adiposidade visceral, sugerimos que o mecanismo principal é a redução do stress causado pelo exercício de baixa intensidade através de outros mecanismos.

Como esperado, a superalimentação pós-natal em ratos induz um aumento no consumo de alimentos aos 180 dias de idade, uma vez que apresentam resistência à leptina no hipotálamo caracterizado por um menor conteúdo de JAK-2, STAT-3 fosforilada e aumento de SOCS-3 [19], com a leptinemia inalterada. Aqui, nós mostramos que o treinamento físico reduz o consumo de alimentos em TO aos 180 dias de idade, provavelmente pela redução da o que poderia normalizar a resistência à leptina central. Esta hipótese é possível uma vez que o exercício físico pode modular a sinalização da leptina no hipotálamo, com o aumento da fosforilação de proteínas-chave (JAK2 e STAT3) da via de sinalização após à administração de leptina no grupo exercitado [38]. Assim, mesmo com níveis de leptina sérica inferiores, o exercício pode aumentar a sensibilidade à leptina e diminuir a ingestão de alimentos.

A redução do HDL-C foi observada no soro de ratos superalimentados sedentários, sendo este resultado corroborado por dados anteriores no nosso grupo [19], que foi normalizada em animais treinados. Os animais TC também apresentaram menor VLDL-c e triglicerídeos corroborando com dados anteriores [12, 39, 40]. Em ratos obesos, o exercício teve uma influência direta sobre o perfil lipídico, com o colesterol total e LDL-c reduzidos, e aumento no HDL-c com um protocolo de treinamento físico muito semelhante ao nosso (5 dias por semana, dia 60 minutos, 27 min / m) [41].

O aumento da pressão arterial é uma característica comum em modelos de EO, o que parece estar associada a anormalidades estruturais e funcionais do sistema renal [25, 42], pelo aumento da produção de citosinas pró- inflamatórias e também estresse oxidativo [49,50]. Além disso, os níveis de leptina maiores neste modelo também poderia contribuir para o aumento da pressão sanguínea [43]. Porém, o treinamento físico foi capaz de normalizar a pressão arterial elevada encontrada em ratos EO provavelmente devido a redução da gordura corporal [44] e da leptina [29]. Estes fator poderia ser um dos possíveis mecanismos de regulação da pressão arterial após a

exposição ao exercício crônico em ratos [45], reforçando os seus efeitos relevantes como uma terapia não-farmacológica para a hipertensão.

Em resumo, o treinamento físico em esteira de baixa intensidade melhora alguns parâmetros metabólicos e hormonais de ratos machos adultos programados pela superalimentação neonatal, demonstrando o potencial do treinamento físico em alterar os padrões da composição corporal e redução nos fatores de risco cardiovascular.

## REFERÊNCIAS:

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 894:i-xii, 1-253.
2. Haslam DW, James WPT. Obesity. *The Lancet* 2005; 366:1197-1209.
3. Godfrey KM, Barker DJP. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 2001; 4: 611-624.
4. Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 2005; 25: 251-269.
5. De Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation-role of adipokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 176-188.
6. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* 2007; 261: 461-471.
7. You S, Gotz F, Rohde W, Dorner G. Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol* 1990; 96: 301-306.
8. Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 2007; 18: 521-524.
9. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM, Garcia M, Señaris RM, Diéguez C. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes* 2007; 31: 371-377.
10. Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol* 2007; 195: 485-494.
11. Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, Dorner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol* 1992; 99: 154-158.
12. Casimiro-Lopes G, Lisboa PC, Koury JC, Boaventura G, Passos MC, Moura EG. Maternal prolactin inhibition during lactation affects physical performance evaluated by acute exhaustive swimming exercise in adult rat offspring. *Horm Metab Res* 2012; 44: 123-129.
13. Boaventura G, Casimiro-Lopes G, Pazos-Moura CC, Oliveira E, Lisboa PC, Moura EG. Effects of running wheel training on adult obese rats programmed by maternal prolactin inhibition. *J Endocrinol* 2013; 219: 1-10.
14. Rodrigues AL, De Moura EG, Passos MCF, Dutra SC, Lisboa PC 2009 Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of Physiology* 587; 2647-2661.
15. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body

- composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 2007; 98: 922.
16. Lowry OH, Roseberough NJ, Sarral, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
  17. Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC, Moura EG. Neonatal hyperleptinemiaprogrammes adrenal medullary function in adult rats: Effects on cardiovascular parameters. *J Physiol* 2007; 580: 629-637.
  18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
  19. Rodrigues AL, Moura EG, Passos MCF, Travenzoli IH, Conceição EPS, Bonomo IT, Neto IFN, Lisboa PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 109-117.
  20. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am J Physiol Endocr Metab* 2005; 288: 1236-1243.
  21. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 38.
  22. Gomes FR, Rezende EL, Malisch JL, Lee SK, Rivas DA, Kelly SA, Lytle C, Yaspelkis BB 3rd, Garland T Jr. Glycogen storage and muscle glucose transporters (GLUT-4) of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *J Exp Biol* 2009; 212: 238.
  23. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti-Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens* 2004; 22: 2363-2369.
  24. Mathieu P, Pibarot P, Larose E, Poirier P, Marette A, Despres JP. Visceral obesity and the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40: 821-836.
  25. Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Daniel L, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: 1944-1949.
  26. Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *HormMetab Res* 2011; 43: 513-516.
  27. Conceição EP, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition: role of insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 81-87.
  28. Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill on body mass and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 515-521.
  29. Hongu N, Sacham DS. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. *J Nutr* 2000; 130: 152-157.

30. Xiang L, Naik J, Hester RL. Exercise-induced increase in skeletal muscle vasodilatory responses in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 987-991.
31. Applegate EA, Upton DE, Stern JS. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. *J Nutr* 1984; 114: 447-459.
32. Paulino EC, Ferreira JCB, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias WJ, Lima FB, Casarini DE, Cicogna AC, Brum PC, Negrão CE. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca<sup>2+</sup>-handling protein profile in obese rats. *Hypertension* 2010; 56: 629-635.
33. Gollish KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshiman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocr Metab* 2009; 297: 495-504.
34. Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.* 2013; 45(1): 22-30.
35. Tharp GD, Buuck RJ. Adrenal adaptation to chronic exercise. *J Appl Physiol* 1974; 37: 720-722.
36. Starzec JJ, Berger DF, Hesse R. Effects of stress and exercise on plasma corticosterone, plasma cholesterol, and aortic cholesterol levels in rats. *Psychosom Med* 1983; 45: 219-226.
37. Park E, Chan O, Li Q, Kiraly M, Matthews SG, Vranic M, Riddell MC. Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: 1360-1371.
38. Flores MB, Fernandes MF, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes* 2006; 55: 2554-2561.
39. Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1167-1172.
40. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 137: 187-196.
41. Tauati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43: 398-407.
42. Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS, Lee JW. Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. *Pediatr Res* 2014; 75: 259-265.
43. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr* 2013; 143: 553-562.
44. Casimiro-Lopes G, Ramos D, Sorenson MM, Salerno VP. 2012 Redox balance and mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase activity in trained rats. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112: 3839-3846.
45. Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, Shen CY, Ma QL, Cao TB, Wang LJ, Nie H, Zidek W, Tepel M, Zhu ZM. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1

- which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354: 427-433.
46. Walker BR., Andrew R. "Tissue Production of Cortisol by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Metabolic Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006 ;1083.1: 165-184.
  47. StaabCA., Maser E. "11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2010; 119.1 : 56-72.
  48. Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Burén, J., Li, X. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoSOne* 2011; 6(11), e25726.
  49. Ye, Z., Huang, Y., Liu, D., Chen, X., Wang, D., Huang, D., Zhou L, Xiao, X. Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyperresponsiveness and inflammation. *PloS one* 2012; 7(10), e47013.
  50. Habbout, A., Li, N., Rochette, L., & Vergely, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short-and long-term pathophysiological consequences. *The Journal of nutrition* 2013; 143(5), 553-562.

### ***Agradecimentos***

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ. Todos os autores são gratos a Monica Moura e o Sr. Ulisses Risso Siqueira pela assistência técnica e cuidados com os animais, bem como Dr. José Firmino Nogueira-Neto, do Laboratório de Lipídios (LabLip, UERJ) para a determinação de lipídios.

### ***Conflito de interesse***

Os autores declaram que não há conflito de interesse que possa ser entendido como prejudicial a imparcialidade da pesquisa relatada.

### ***Contribuição dos autores***

Concepção e desenho da pesquisa: EGM e PCL. Tratamento animal, recolha e medições: SPF, GCL, GBC e EPSC. Análise e interpretação dos dados: SPF, GCL, EGM e PCL. Elaboração e / ou revisão do artigo e críticas do conteúdo intelectual: SPF, GCL, GBC, EPSC, JPSWC, EO, EGM e PCL

## **EFFECTS OF TREADMILL TRAINING IN ADULT OBESE RATS PROGRAMMED BY POSTNATAL EARLY OVERNUTRITION**

*Stephan Pinheiro Frankenfeld<sup>1,2</sup>, Gustavo Casimiro-Lopes<sup>1</sup>, Gabriel Boaventura<sup>1</sup>, Ellen Paula Santos Da Conceição<sup>1</sup>, Elaine Oliveira<sup>1</sup>, Egberto Moura<sup>1</sup>, Patrícia Lisboa<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ*

<sup>2</sup> *Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ*

**Correspondence to:** [pclisboa.uerj@gmail.com](mailto:pclisboa.uerj@gmail.com)

*Submitted in May 6<sup>th</sup> 2016*

*First editorial decision in May 25<sup>th</sup> 2016*

*Accepted in July 7<sup>th</sup> 2016*

### **ABSTRACT**

Postnatal early overnutrition (EO) is a risk factor for obesity and metabolic disorders. Rats raised in small litters develop obesity, hyperphagia, leptin resistance, dyslipidemia, insulin resistance and hypertension when adults. As chronic exercise brings well-known benefits to obese individuals, we studied the effects of training on treadmill in adult obese rats programmed by EO during lactation. Postnatal EO was induced by reducing the litter size to 3 pups/litter; groups with normal litter size (10 pups) were used as control. After weaning, rats had free access to standard diet and water. At 75 days-old, rats raised in small and normal litters were divided into (n=7/group): sedentary overfed (SO), trained overfed (TO), sedentary control (SC) and trained control (TC). A speed test was performed in all rats to establish the training parameters of velocity and intensity. Exercise training began at 90 days-old until 180 days-old for TC and TO rats (60min/day, 5days/week, 65% of the acute treadmill test). At 180 days-old all groups were sacrificed for blood and tissue collection. Exercise training was able to reduce corticosteronemia and leptinemia in both EO and controls (TO and TC). However, triglyceridemia was only reduced in controls (TC). TO animals showed lower body weight, adiposity, food intake and systolic blood pressure. However, they presented higher protein content and HDLc serum levels, suggesting an improvement in parameters associated with metabolic syndrome caused by overfeeding during lactation. In conclusion, we observed that low intensity physical training attenuated some of the metabolic and hormonal alterations induced by postnatal overnutrition in male rats.

**Keywords:** Overfeeding; Developmental plasticity; Obesity; Physical training.

## INTRODUCTION

Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat, in response to positive energy balance and is usually associated with many diseases [1]. Several factors can lead to obesity, such as changes in eating behavior and energy metabolism, sedentary lifestyle, genetic and environmental influences as well as psychosocial and neurological conditions [2].

Several studies have been shown that changes in nutritional and hormonal profile in early life can imprint epigenetic changes and program permanent or long-term change in the structure or function of the organism [3-5]. Nowadays, “programming” was renamed as “developmental plasticity” due to be more probabilistic than deterministic and it can present further changes during development [6].

Postnatal early overnutrition (EO) can be induced by litter size reduction, which is an appropriate experimental model to study short and long term consequences of obesity caused by neonatal overfeeding. Animals raised in small litters develop hyperphagia, leptin resistance, visceral obesity, hypertension, lower HDL-c in later life, which are well known components of the metabolic syndrome and associated with high cardiovascular risk [7-11].

Metabolic changes induced by the programming, which were previously cited may be aggravated by sedentary lifestyle, and directly influence the physical capacity as was observed in animals subjected to maternal prolactin restriction during lactation (programming model induced by early weaning) having a phenotype compatible with the metabolic syndrome [12].

In a later study in early weaning model, it was observed that physical training in motorized racing wheel, could exert positive adaptations containing this deleterious profile. However, this method has some structural limitations and may require increase in training intensity [13].

Treadmill training is a better known model of exercise and since the two programming models (early overnutrition and early weaning) produce similar pattern of metabolic syndrome components, we hypothesize that low intensity exercise could ameliorate those deleterious programmed effects in EO animals. Thus, we evaluated in a rat model of postnatal EO if exercise training could reverse some of the endocrine/metabolic disturbances observed in this model using chronic exercise in treadmill running based in individual running velocity.

## METHODS

### *Animals and experimental design.*

Our experimental design was approved by the Animal Care and Use Committee of the Biology Institute of the State University of Rio de Janeiro (CEUA/014/2009). The handling of experimental animals followed the principles adopted in Brazil according the Brazilian Law no. 11.794/2008. Experiments were performed to minimize the number of rats and the suffering, following the ethical doctrine of the three “R”s - reduction, refinement and replacement.

Wistar rats were housed in controlled temperature room (23-25 °C) with 12 h light: dark cycle (7:00 am to 7:00 pm). Adult virgin female rats were caged with male rat (3:1). During pregnancy and lactation, mothers were housed in individual cages and had water *ad libitum* and standard pellet diet (Purine, Paraná, Brazil). To induce EO, litter size was adjusted to 3 male pups per each litter (**small litter**) at 3 days-old [14]. Litter containing 10 pups per mother served as control (**normal litter**) [10]. After weaning, rats had free access to standard diet and water (3 rats per cage). Body weight



gain and food intake were measured and controlled from postnatal day (PN) 21 to 180 (data not shown). The results presented in this paper are related with last measurement of body weight and food intake was measured by determination of 24 h consumption of standard pellets. In the present study, 14 different litters (small, n=7 and normal, n=7) were used and we randomly assigned 2 animals of each group (14 overfed rats and 14 control rats).

### ***Maximum speed test.***

This test was applied to evaluate exercise speed in all animals ensuring individualized exercise intensity. At 75 days-old, rats from small (overfed) and normal (control) litters were subjected to 2-3 days of acclimation period of treadmill running (10 min/m for 5 minutes). Following this period, the animals were subjected to a maximal speed test. The test was performed without inclination, at a speed of 10 min/m, increased by 1.2 m/ min every 2 minutes until exhaustion. Exhaustion was characterized when the rats refuse to run even after electrical stimulation promoted by the grid in the back of the lane.

### ***Training protocol.***

At 90 days-old, the rats were divided into 4 groups (7 rats/each group): **sedentary control (SC)**, rats raised in normal litters), **trained control (TC)**, rats raised in normal litters that were trained), **sedentary overfed (SO)**, rats raised in small litters), **trained overfed (TO)**, rats raised in small litters that were trained). From PN 90 until 180, TC and TO groups initiated the chronic training sessions on a treadmill (Insight, Ribeirão Preto, Brazil), 5 days/week. At 8<sup>th</sup> week, intensity and volume were fixed by the end of training, with 60 minutes of training at 20 m/min, which is equivalent to 65 % of the maximum speed achieved at previous test (Table 1). The shock grid was neutralized by insertion of plastic barriers, to reduce stress and the injury to paw and tail during training sessions.

### ***Euthanasia procedures and blood collection.***

One week before sacrifice, systolic blood pressure (SBP) was measured noninvasively in conscious rats by tail cuff pletismography (LE 5000, LETICA Scientific Instruments, Barcelona, Spain). The first measurement of SBP was discarded and the mean of three subsequent measurements was recorded. In this period glycaemia was determined in blood sample from the tail vein using a glucosimeter (Accu-Chek<sup>®</sup> Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In PN 180, all animals were killed with a lethal dose of ketamine hydrochloride/xylazine hydrochloride (2:1). Blood was obtained by cardiac puncture, centrifuged (1,000xg at 4 °C for 30 min) and serum was stored at -20°C until assayed. The following tissues were collected to quantification and/ or biochemical evaluation: liver, adrenal and visceral fat mass.

### ***Body composition.***

The visceral fat mass (mesenteric, epididymal and retroperitoneal white adipose tissue) was excised and immediately weighed for evaluation of central adiposity. Fat and protein mass were determined by carcass analysis as reported previously [15]. After sacrifice, offspring were eviscerated; the carcasses were weighed, autoclaved for 1 h and homogenized in distilled water (1:1 w/v). Homogenates were stored at -20°C for analysis.

Three grams of homogenate were used to determine fat mass gravimetrically. Samples were hydrolyzed in a shaking water bath at 70°C for 2 h with 30% KOH and

ethanol (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil). Total fatty acids and free cholesterol were removed by three successive washes with petroleum ether (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil). After drying overnight in a vacuum, tubes were weighed, and data were expressed as g fat per 100 g carcass. Protein content was determined in 1 g of homogenate. Tubes were centrifuged at 2000 g for 10 min. Total protein concentrations were determined by the method of Lowry et al [16]. Results were expressed as g protein per 100 g carcass.

**Hormone measurement.**

All measurements were performed in a unique assay. Serum leptin was determined by RIA kit (Linco Research<sup>™</sup>, St Charles, MO, USA). The sensitivity limit and intra-assay variation were 0.5 ng/ml and 6.9%, respectively. Serum insulin was determined by RIA kit (ICN Pharmaceuticals Inc<sup>™</sup>., Orangeburg, NY, USA) with an assay sensitivity of 0.1 ng/ml and an intra-assay variation of 4.1%. Serum total corticosterone was measured using a specific commercial RIA kit (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) with an assay sensitivity of 50 ng/mL and an intra-assay variation coefficient of 7%.

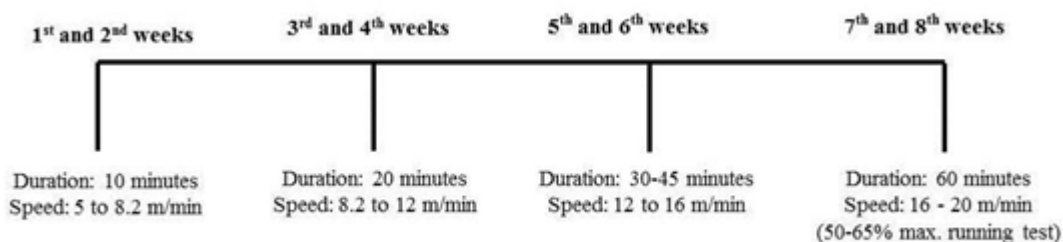
Total catecholamine content (epinephrine and norepinephrine) was determined in adrenal gland using the trihydroxyndole fluorescence method [17]. Left adrenal glands were homogenized in 500 µL of 10% acetic acid and centrifuged (10.000 xg for 1 min). For the assay, 50 µL of the supernatant/epinephrine standards were mixed with 250 µL of phosphate buffer (0.5 M, pH 7.0) and 25 µL of potassium ferricyanate (0.5%) followed by incubation (20 min; ice bath). The reaction was stopped with 500 µL of ascorbic acid/NaOH 10 N (1:19). The parameters used in the fluorimeter (Victor2, PerkinElmer, MA, USA) were 420 nm excitation and 510 nm emission. Results were obtained by plotting the values as a linear regression of the standard epinephrine curve. Data were expressed as µMcatecholamines/mL.

**Lipid profile.**

Total cholesterol (TC), triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) were analyzed using Biosystem<sup>™</sup> commercial test kits with an automated A15 spectrophotometer (Biosystems S.A., Barcelona, Spain). LDL-c and VLDL-c were calculated according to Friedewald equation [18].

**Statistical analysis.**

GraphPad Prism 5 program was used for statistical analysis and graphics (GraphPad softwares, Inc., La Jolla, CA, USA). Two-way ANOVA was applied with post-test Tukey Data are expressed as means ± SE, and p < 0.05 was accepted assignificant.

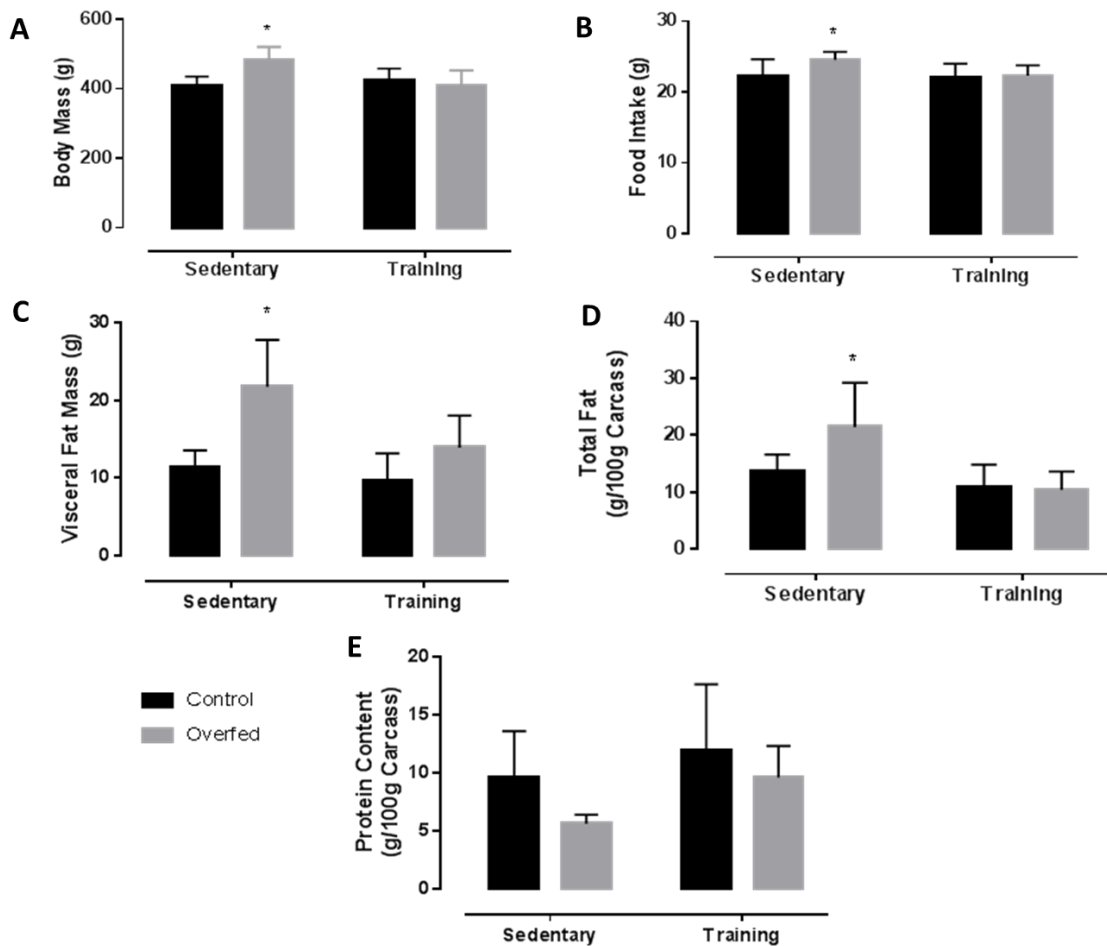


**RESULTS**

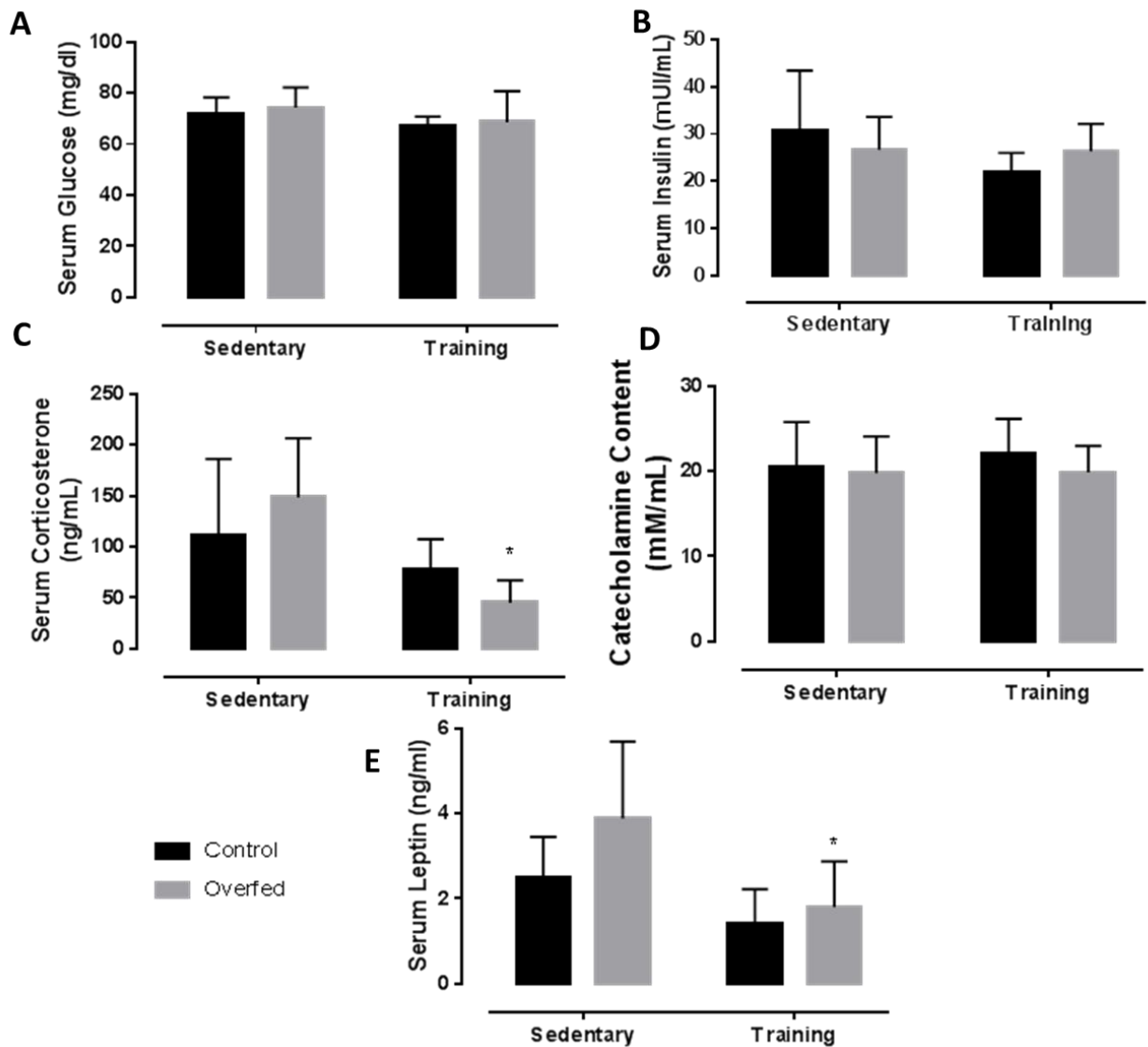
At 75 days-old, there were no differences between the two groups (overfed:  $34.0 \pm 3.2$  min vs control:  $33.9 \pm 4.8$  min) in the maximum speed test.

At 180 days, SO group showed higher body mass (Figure 2A) and hyperphagia, which was reversed in trained overfed animals (Figure 2B; -8.1%;  $p < 0.05$ ). Additionally, these animals also showed higher visceral fat (Figure 2C; 1.5 fold-increase;  $p < 0.05$ ) and total carcass fat content (Figure 2D; 95%;  $p < 0.05$ ) with lower protein content (Figure 2E; -37%,  $p < 0.05$ ). Interestingly, the exercise training program restored body composition related to fat mass and protein content to similar pattern observed in SC and TC animals. This low intensity training was not able to change those parameters in control animals.

Blood glucose and serum insulin concentrations did not show any significant differences (Figures 3A and 3B). The same pattern was also observed for catecholamine content in adrenal gland (Figure 3D). However, trained animals (TC and TO) showed lower serum corticosterone (Figure 3C; -54% and -64% respectively;  $p < 0.05$ ) and leptin levels (Figure 3E; -48% and -56% respectively;  $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Body mass (A), food intake (B), visceral fat mass (C), total fat mass (D) and protein content of the carcass (E) of sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary overfed (SO), trained overfed (TO) rats at 180 days-old. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 7$  per group. \* $p < 0.05$  vs all groups.



**Figure 3.** Glycemia (A), insulinemia (B), corticosteronemia (C), adrenal catecholamine content (D) and leptinemia (E) of sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary overfed (SO), trained overfed (TO) rats of sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary overfed (SO), trained overfed (TO) rats in PN 180. Values are means  $\pm$  SE. n=7 per group. \*p<0.05 vs SC; #p<0.05 vs SO.

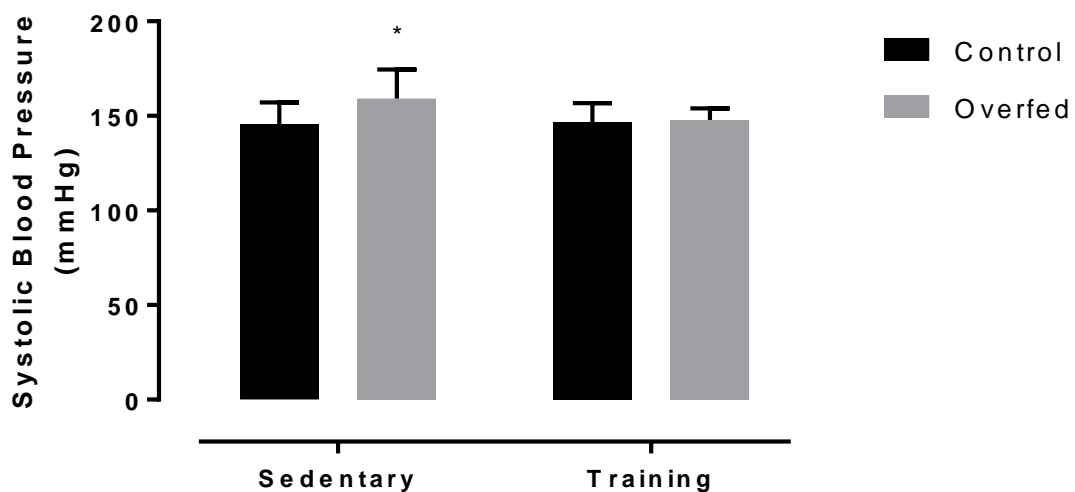
No significant differences were observed in serum total cholesterol and LDL-c in all groups (Table 1). TC group showed lower VLDL-c (-31%,  $p<0.05$ ) and triglycerides (-32%,  $p<0.05$ ). As expected, SO group has a lower HDL-c (-11%;  $p<0.05$ ) than the CS group, while TO group normalized the serum HDL-c concentrations.

Postnatal overfeeding caused higher systolic blood pressure in adult life (Figure 4; +10%;  $p<0.05$ ) and exercise training induced a normalization of this parameter.

**Table 1: Lipid profile of control and overfed rats at 180 days-old.**

	SEDENTARY CONTROL	TRAINED CONTROL	SEDENTARY OVERFED	TRAINED OVERFED
Total cholesterol (mg/dl)	77.9 ± 2.4	73.0 ± 3.1	76.9 ± 4.1	77.0 ± 3.7
LDL-c (mg/dl)	41.8 ± 2.6	43.2 ± 3.1	41.2 ± 4.2	39.2 ± 3.4
HDL-c (mg/dl)	22.8 ± 0.6	20.7 ± 0.7	20.2 ± 0.7 *	23.4 ± 1.7
VLDL-c (mg/dl)	13.9 ± 1.1	9.55 ± 0.8 #	15.0 ± 1.3	14.3 ± 0.6
Triglycerides (mg/dl)	69.6 ± 5.4	47.6 ± 4.2 #	74.4 ± 6.4	71.1 ± 3.0

High-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-c). Values represented as mean ± SEM of 7 rats per group,  $p<0.05$ . \*vs Sedentary Control, Trained Overfed; # vs all groups



**Figure 4.** Systolic blood pressure of sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary overfed (SO), trained overfed (TO) rats in PN 180. Values are means ± SE. n=7 per group. \* $p<0.05$  vs all groups.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this present study, we observed that postnatal overfeeding, induced by litter size reduction, increases the body weight during lactation and during all development. Our data reinforce previous studies from our group [10, 14, 19] and other authors [11, 20]. In the present study we reported that treadmill exercise in EO animals improved the cardiovascular risk through normalizing some parameters observed in these animals, such as altered body composition pattern and cardiovascular risk factors.

For the prescription of exercise training was performed at 75 days of life, a maximum speed test on the treadmill. This test has a significant correlation with VO<sub>2</sub> max test and can be a good alternative to prescription physical training [21]. In our study, there were no differences on physical capacity between control (rats raised in normal litters) and programmed overfed group (rats raised in small litters) at that age. Corroborating these findings, overweight Wistar rats fed with high fat diet that were submitted to a maximum speed test showed no difference in physical capacity [22].

The adipose tissue distribution in obesity is very important, since regional fat deposition confers higher cardiovascular risk [20, 23, 24] and exercise training reduces body fat, depending on the intensity and volume of training. Our and previous studies suggest that neonatal obesity induced by postnatal overnutrition could be a risk factor for cardiovascular disease and metabolic syndrome in later life, mainly because increases visceral adiposity, systolic blood pressure and reduces HDLc serum levels [11, 25, 26]. SO animals presented higher central, total adiposity and lower protein mass, corroborating previous studies from our group [14, 19, 26, 27]. The effect of exercise training upon bodyweight and/or fat mass is corroborated by many independent studies [28-33]. In this study we evaluated further effects of chronic treadmill training in body composition through carcass analysis and visceral fat mass extraction demonstrating that physical exercise was able to reverse the deleterious body composition pattern promoted by EO, with these animals showing normalized values for fat indicators (visceral fat and total fat) and total protein content in the carcass.

On the other hand, the physical training was capable of reducing corticosterone in the serum of TC and TO groups in equal proportions, which confirms a study in which animals were subjected to low-voltage electrical shock (where rapidly increasing the serum corticosterone of the animal) and immediately have access for 3 hours at a wheel activity (high volume exercise) also showed, after activity a lesser quantity of corticosterone in the plasma [34, 35]

The results of the present study are in agreement with previous studies showing the lowering effect of chronic exercise upon corticosterone levels [13, 36, 37]. The lower visceral fat found in TO group can contribute to a lower corticosteronemia, since this is also produced by the conversion of 11-dehydrocorticosterone for 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1) in rodents [46, 47, 48].

As expected, early overfeeding in sedentary animals induces an increase in food consumption at 180 days-old since they present hypothalamic leptin resistance featured by lower JAK-2, pSTAT-3 and higher SOCS-3 contents [19], with unchanged leptinemia. Here, we showed that exercise training reduces food consumption in TO at 180 days-old probably by the reduction of leptinemia which could normalize the central leptin resistance. This hypothesis is possible since exercise training could modulate leptin signaling in the hypothalamus, with increased phosphorylation of key proteins (JAK2 and STAT3) of the signaling pathway following administration of leptin in the exercised group [38]. Thus, even with lower serum leptin levels, the exercise by increasing leptin sensitivity can decrease food intake.

Lower serum HDL-c observed in sedentary overfed is a feature corroborated by previous data in our group [19], which was normalized in trained animals. TC animals also presented lower VLDL-c and triglycerides levels corroborating previous data [12, 39, 40]. In obese mice, exercise has a direct influence on lipid profile, with lower total cholesterol and LDL-c, and higher HDL-c with a study protocol very similar to ours (5 days week, 60 minutes day, 27 min/ m) [41].

Increased blood pressure is a common characteristic EO models, which could be related to structural and functional abnormalities of renal system [25, 42], by the increased production of pro inflammatory cytokines and also oxidative stress [49,50 ]. Additionally, higher leptin levels in this model could also contribute to increased blood pressure [43]. Exercise training was able to normalize high blood pressure found in EO rats probably due to its fat mass [44] and leptin reduction effects [29]. These factor could be one of the possible mechanisms of blood pressure regulation after exposure to chronic exercise in rats [45], reinforcing its relevant effects as a non-pharmacological therapy for hypertension.

In summary, low-intensity physical exercise in treadmill running improves some metabolic and hormonal parameters of adult male rats programmed by neonatal overfeeding, showing the potential of physical training to body composition pattern modification and lowering of cardiovascular risk factors.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) and State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ). All authors are grateful to Miss Monica Moura and Mr. UlissesRissoSiqueira for technical assistance and animal care as well as Dr. José FirminoNogueira-Neto from Laboratory of Lipids (LabLip, UERJ) for lipids determination.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### **REFERENCES**

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 894:i-xii, 1-253.
2. Haslam DW, James WPT. Obesity. The Lancet 2005; 366:1197-1209.
3. Godfrey KM, Barker DJP. Fetal programming and adult health. Public Health Nutr 2001; 4: 611-624.
4. Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. Biosci Rep 2005; 25: 251-269.
5. De Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation-role of adipokines and neuropeptides. Neuroimmunomodulation 2008; 15: 176-188.
6. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. J Intern Med 2007; 261: 461-471.

7. You S, Gotz F, Rohde W, Dorner G. Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol* 1990; 96: 301-306.
8. Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 2007; 18: 521-524.
9. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM, Garcia M, Señaris RM, Diéguez C. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes* 2007; 31: 371-377.
10. Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol* 2007; 195: 485-494.
11. Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, Dorner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol* 1992; 99: 154-158.
12. Casimiro-Lopes G, Lisboa PC, Koury JC, Boaventura G, Passos MC, Moura EG. Maternal prolactin inhibition during lactation affects physical performance evaluated by acute exhaustive swimming exercise in adult rat offspring. *Horm Metab Res* 2012; 44: 123-129.
13. Boaventura G, Casimiro-Lopes G, Pazos-Moura CC, Oliveira E, Lisboa PC, Moura EG. Effects of running wheel training on adult obese rats programmed by maternal prolactin inhibition. *J Endocrinol* 2013; 219: 1-10.
14. Rodrigues AL, De Moura EG, Passos MCF, Dutra SC, Lisboa PC 2009 Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of Physiology* 587; 2647-2661.
15. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 2007; 98: 922.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Sarral, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
17. Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC, Moura EG. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: Effects on cardiovascular parameters. *J Physiol* 2007; 580: 629-637.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
19. Rodrigues AL, Moura EG, Passos MCF, Travenzoli IH, Conceição EPS, Bonomo IT, Neto IFN, Lisboa PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 109-117.
20. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am J Physiol Endocr Metab* 2005; 288: 1236-1243.
21. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 38.
22. Gomes FR, Rezende EL, Malisch JL, Lee SK, Rivas DA, Kelly SA, Lytle C, Yaspelkis BB 3rd, Garland T Jr. Glycogen storage and muscle glucose transporters



- (GLUT-4) of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *J Exp Biol* 2009; 212: 238.
23. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti-Trevano F, Bolla GB, Mancina G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens* 2004; 22: 2363-2369.
  24. Mathieu P, Pibarot P, Larose E, Poirier P, Marette A, Despres JP. Visceral obesity and the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40: 821-836.
  25. Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Daniel L, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* [2007](#); 293: 1944-1949.
  26. Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *HormMetab Res* 2011; 43: 513-516.
  27. Conceição EP, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition: role of insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 81-87.
  28. Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill on body mass and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 515-521.
  29. Hongu N, Sacham DS. Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. *J Nutr* 2000; 130: 152-157.
  30. Xiang L, Naik J, Hester RL. Exercise-induced increase in skeletal muscle vasodilatory responses in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 987-991.
  31. Applegate EA, Upton DE, Stern JS. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. *J Nutr* 1984; 114: 447-459.
  32. Paulino EC, Ferreira JCB, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias WJ, Lima FB, Casarini DE, Cicogna AC, Brum PC, Negrão CE. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca<sup>2+</sup>-handling protein profile in obese rats. *Hypertension* 2010; 56: 629-635.
  33. Gollish KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshiman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocr Metab* 2009; 297: 495-504.
  34. Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res*. 2013; 45(1): 22-30.
  35. Tharp GD, Buuck RJ. Adrenal adaptation to chronic exercise. *J Appl Physiol* 1974; 37: 720-722.
  36. Starzec JJ, Berger DF, Hesse R. Effects of stress and exercise on plasma corticosterone, plasma cholesterol, and aortic cholesterol levels in rats. *Psychosom Med* 1983; 45: 219-226.
  37. Park E, Chan O, Li Q, Kiraly M, Matthews SG, Vranic M, Riddell MC. Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: 1360-1371.

38. Flores MB, Fernandes MF, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, Saad MJ, Carnevalheira JB. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes* 2006; 55: 2554-2561.
39. Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *FoodChem Toxicol* 2006; 44: 1167-1172.
40. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 137: 187-196.
41. Tauati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med SciSports Exerc* 2011; 43: 398-407.
42. Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS, Lee JW. Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats. *Pediatr Res* 2014; 75: 259-265.
43. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr* 2013;143: 553-562.
44. Casimiro-Lopes G, Ramos D, Sorenson MM, Salerno VP. 2012 Redox balance and mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase activity in trained rats. *Eur JAppl Physiol* 2012; 112: 3839-3846.
45. Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, Shen CY, Ma QL, Cao TB, Wang LJ, Nie H, Zidek W, Tepel M, Zhu ZM. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354: 427-433.
46. Walker BR., Andrew R. "Tissue Production of Cortisol by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Metabolic Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006 ;1083.1: 165-184.
47. StaabCA., Maser E. "11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2010; 119.1 : 56-72.
48. Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Burén, J., Li, X. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoSOne* 2011; 6(11), e25726.
49. Ye, Z., Huang, Y., Liu, D., Chen, X., Wang, D., Huang, D., Zhou L, Xiao, X. Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyperresponsiveness and inflammation. *PloS one* 2012; 7(10), e47013.
50. Habbout, A., Li, N., Rochette, L., & Vergely, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short-and long-term pathophysiological consequences. *The Journal of nutrition* 2013; 143(5), 553-562.