



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

DIEGO BULÇÃO VISCO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO NEONATAL À FLUOXETINA SOBRE A PLASTICI-
DADE FENOTÍPICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS
À DIETA MATERNA PERINATAL HIPERLIPÍDICA E HIPERCALÓRICA.**

RECIFE

2018

DIEGO BULCÃO VISCO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO NEONATAL À FLUOXETINA SOBRE A PLASTICIDADE FENOTÍPICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA MATERNA PERINATAL HIPERLIPÍDICA E HIPERCALÓRICA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Linha de pesquisa: “Fisioterapia: Desempenho físico-funcional e qualidade de vida.”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano da Silva Castro,

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Isabel da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro.

RECIFE

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

V824e Visco, Diego Bulcão.

Efeitos da exposição neonatal à fluoxetina sobre a plasticidade fenotípica do músculo esquelético de ratos submetidos à dieta materna perinatal hiperlipídica e hipercalórica / Diego Bulcão Visco. - Recife: o autor, 2018.

93 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano da Silva Castro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Fisioterapia.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Músculo esquelético. 2. Inibidores de captação de serotonina. 3. Plasticidade celular. 4. Dieta hiperlipídica. I. Castro, Ana Elisa Toscano da Silva (orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 146)

**"EFEITOS DA EXPOSIÇÃO NEONATAL À FLUOXETINA SOBRE A PLASTICIDADE FENOTÍ-
PICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA MATERNA PERINA-
TAL HIPERLIPÍDICA E HIPERCALÓRICA"**

DIEGO BULCÃO VISCO

APROVADO EM: 27/02/2018

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA CASTRO

COORIENTADORES: PROF. DR. RAUL MANHÃES DE CASTRO

DR.^a ALINE ISABEL DA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF.^a DR.^a KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA LAMBERTZ – FISIOTERAPIA/ CCS/ UFPE

**PROF.^a DR.^a ISABELI LINS PINHEIRO – NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ES-
PORTE / CAV/ UFPE**

**PROF.^a DR.^a CLÁUDIA JACQUES LAGRANHA – NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS
DO ESPORTE / CAV/ UFPE**

Visto e permitida à impressão

Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

Dedico esta dissertação à minha família
que tanto apoiou o meu crescimento
pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus. Obrigado Pai. Por ter me dado saúde, sabedoria e discernimento para superar todas as provações para chegar até aqui.

Aos meus pais Delma Bulcão e Sávio Visco, e irmã Gabriele por serem minha base. Nada disso seria possível sem o incondicional apoio para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha esposa Jéssica pelo amor, companheirismo e esforço por estar sempre ao meu lado.

À minha filha que ainda no ventre da mãe me deu forças para seguir adiante.

Aos meus Professores Ana Elisa Toscano e Raul Manhães de Castro por terem ido além do papel de orientar no âmbito acadêmico. Certo que levarei os ensinamentos e conselhos por toda a vida, obrigado.

Aos professores, colegas de turma e funcionários do Programa Pós-Graduação de Fisioterapia, em especial agradeço a Senhora Niége pela presteza.

Aos professores, discentes e funcionários do Departamento de Nutrição, em especial ao Senhor França pela orientação no cuidado com os animais.

Aos professores e discentes do Centro Acadêmico de Vitória que me auxiliaram na condução do projeto, em especial a equipe do Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício por abrir as portas para realização das análises.

Aos colegas do grupo “Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica” por todo apoio diário e experiências compartilhadas.

À todos os amigos que contribuíram e incentivaram para conclusão desta etapa.

À toda minha família pela torcida, incentivo e orações.

“Lança o teu cuidado sobre o Senhor e ele te susterá; não permitirá que o justo seja abalado.”

(Salmos 55:22)

RESUMO

Avaliar em curto e longo prazo as repercussões do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a proporção de fibras musculares e atividade enzimática muscular em ratos expostos ou não à dieta materna hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e lactação. Ratas *Wistar* (n=20) foram alocadas de acordo com a manipulação dietética, sendo: (NN, dieta normolipídica e normocalórica, 354 Kcal/100g vs. HH, dieta hiperlipídica e hipercalórica, 483,93 Kcal/100g). No primeiro dia pós-natal, filhotes machos (n=64) foram alocados de acordo com a exposição à dieta materna e tratamento farmacológico durante a lactação com fluoxetina (10 mg/Kg) ou salina (0,9% NaCl), sendo: (NS, NN + salina; NF, NN + fluoxetina; HS, à HH + salina; HF: HH + fluoxetina. O peso corporal, a circunferência abdominal e torácica, comprimento naso-anal durante a lactação e consumo alimentar foram analisados. Os animais realizaram o Teste de Tolerância a Glicose (TTG) e a Insulina (TTI). Para a retirada dos músculos Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL), de acordo com a alocação no grupo 30º ou no 90º dia de vida, foram avaliados o peso muscular, a proporção dos tipos de fibras musculares e atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) e da Lactato Desidrogenase (LDH). As ratas do grupo HH apresentaram peso reduzido ao final da gestação e lactação comparado ao grupo NN. Ao nascerem, o grupo HS apresentou baixo peso, permanecendo reduzido em fase adulta, assim como as características murinométricas apresentaram redução comparado ao grupo NS. No grupo NF foi observado redução do peso corporal em fase precoce e tardia da vida comparado ao grupo NS. O grupo HS apresentou consumo alimentar reduzido comparado ao grupo NS aos 30 dias. Os filhotes do grupo NF apresentaram consumo alimentar reduzido comparado ao NS em todo período experimental. O grupo HF apresentou consumo reduzido comparado ao HS aos 60 e 90 dias de idade. Não foram observadas diferenças no TTG e TTI. O grupo HS apresentou no sóleo aos 30 dias redução no peso muscular, aumento de fibras tipo I e redução da atividade de LDH comparado ao NS. Enquanto o músculo EDL desses animais nessa idade apresentou menor proporção de fibras tipo IIB e redução da atividade da LDH comparado aos filhotes normonutridos. Os animais do grupo HS aos 90 dias o músculo EDL apresentaram redução na atividade da CS. O grupo NF apresentou redução no peso muscular, aumento nas fibras tipo I e tipo IIA no EDL comparado ao NS. No grupo NF observou-se aumento da CS no EDL aos 30 dias de idade. Enquanto o sóleo apresentou redução da LDH aos 30 dias comparado ao NS. Aos 90 dias, aumento na proporção de fibras tipo IIA foram observados no EDL no grupo NF. Aos 90 dias o grupo HF apresentou redução nas fibras tipo IIB no EDL. Nessa idade a CS estava aumentada comparada ao HS. A exposição neonatal a fluoxetina manteve a proporção de fibras tipo I e IIA e capacidade oxidativa do músculo esquelético de filhotes expostos à dieta materna hiperlipídica/hipercalórica em período perinatal.

Palavras-Chave: Músculo esquelético. Inibidores de captação de Serotonina. Dieta Hiperlipídica. Plasticidade Celular.

ABSTRACT

To assess in short and long-term the effects of neonatal treatment with fluoxetine on the proportion of muscle fibers and muscle enzymatic activity in rats exposed or not to a maternal high-fat diet during gestation and lactation. Wistar rats ($n = 20$) were allocated according to dietary manipulation, being: (NN, normolipidic and normocaloric diet, 354 Kcal / 100g vs. HH, high-fat diet, 483.93 Kcal / 100g). On the first postnatal day, male offspring ($n = 64$) were allocated according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment during lactation with fluoxetine (10 mg / kg) or saline (0.9% NaCl), being: Body weight, abdominal and thoracic circumference, naso-anal length during lactation, and food intake were analyzed. Animals were tested for glucose tolerance (TTG) and Insulin (TTI). For the dissection of the soleus and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles, according to allocation in the groups of a 30th or 90th days of life, the proportion of muscle fiber types and the enzymatic activity of Citrate Synthase (CS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) were assessed. The HH group showed a reduced body weight at the end of gestation and lactation compared to the NN group. The HS group presented low birth weight, remaining low in adult phase, as well as the murinometric characteristics presented reduction compared to the NS group. In the NF group, body weight reduction was observed in the early and late phases of life compared to the NS group. The HS group had reduced food intake compared to the NS group at 30 days. The offspring of the NF group had reduced food intake compared to NS during the whole experimental period. The HF group had reduced food intake compared to HS at 60 and 90 days of age. There were no differences in TTG and TTI. The HS group presented a reduction in muscle weight, an increase of type I fibers and reduction of LDH activity compared to NS in the soleus at 30 days. While the EDL muscle of these animals at that age had a lower proportion of type IIB fibers and a reduction in LDH activity compared to the NS pups. The animals of the HS group at 90 days, the EDL muscle presented a reduction in CS activity. The NF group presented reduction in muscle weight, increase in type I fibers and type IIA in EDL compared to NS. In the NF group, there was an increase in CS in EDL at 30 days of age. While the soleus presented LDH reduction at 30 days compared to NS. At 90 days, increase in the proportion of fibers type IIA were observed in EDL in the NF group. At 90 days, the HF group presented a reduction in type IIB fibers in EDL. At that age, CS was increased compared to HS. Neonatal exposure to fluoxetine maintained the proportion of type I and IIA fibers and oxidative capacity of the skeletal muscle of puppies exposed to a maternal high-fat diet in the perinatal period.

Keywords: Skeletal muscle. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. High-fat Diet. Cell Plasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais.....	34
Tabela 1. Classificação das fibras musculares.....	19
Tabela 2. Ingredientes utilizados na confecção da dieta hiperlipídica/hipercalórica..	32
Tabela 3. Composição centesimal das dietas controle e hiperlipídica/hipercalórica .	33

LISTA DE SIGLAS

Acetil Coa	Acetil Coenzima-A
ATP	Adenosina Trifosfato
CS	Citrato Sintase
EDL	Extensor Longo dos Dedos
FRM	Fatores de Regulação Miogênica
HF	Filhotes expostos a dieta materna hiperlipídica e hipercalórica que receberam administração neonatal com fluoxetina
HH	Dieta Hiperlipídica e Hipercalórica
HS	Filhotes expostos a dieta materna hiperlipídica e hipercalórica que receberam administração neonatal com salina
ISRS	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
LDH	Lactato Desidrogenase
MHC	Myosin Heavy Chain
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF	Filhotes expostos a dieta materna normolipídica e normocalórica que receberam administração neonatal com fluoxetina
NN	Dieta Normolipídica e Normocalórica
NS	Filhotes expostos a dieta materna normolipídica e normocalórica que receberam administração neonatal com salina
PGC1 α	Coativador Alfa do receptor Gama ativado por Proliferador de peroxissoma
PN	Pós-natal
POMC	Neuropeptídeo Propiomelanocortina
RNA	Ácido Ribonucleico
SERT	Transportador da receptação de serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
TPH	Triptofano Hidroxilase
TTG	Teste de Tolerância à Glicose
TTI	Teste de Tolerância à Insulina
5-HT	Serotonina
5-HT2A	Receptor de serotonina 5-HT2A
5-HT2B	Receptor de serotonina 5-HT2B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 O desenvolvimento do músculo esquelético	15
2.2 Nutrição e desenvolvimento do músculo esquelético	21
2.3 Manipulações do sistema serotoninérgico e plasticidade do desenvolvimento ...	25
3 HIPOTESES.....	31
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo Geral	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 Animais e condições experimentais	31
5.2 Grupos experimentais	32
5.3 Tratamento farmacológico e controle	33
5.4 Características murinométricas	34
5.5 Avaliação do consumo alimentar	35
5.6 Testes de Tolerância à glicose e à insulina.....	35
5.7 Coleta de amostra muscular.....	35
5.8 Análises das proporções de fibras musculares	36
5.9 Análise da atividade enzimática	37
6 Classificações das Variáveis	38
6.1 Variáveis Independentes	38
6.2 Variáveis Dependentes	38
7 Análise Estatística	38
8 RESULTADOS	39
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
10 PERSPECTIVAS.....	40

REFERÊNCIAS.....	41
Apêndice 1 - ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA.....	58
Apêndice 2 - ARTIGO ORIGINAL	75
Anexo 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS	93

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa “Fisioterapia: Desempenho físico-funcional e qualidade de vida” do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco. As atividades foram realizadas no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição. O grupo de pesquisa “Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica” estuda as consequências de agressões durante período perinatal sobre o músculo esquelético. Os estudos envolvem modificações decorrentes de distúrbios nutricionais (desnutrição e obesidade) e o uso de fármacos. São realizadas análises experimentais morfológicas, metabólicas e funcionais do músculo esquelético. Os resultados obtidos até o momento ajudam esclarecer a importância evolutiva da adaptação nutricional perinatal, podendo ter repercussões sobre a compreensão do desenvolvimento de doenças metabólicas. Por outro lado, o estudo da ação de fármacos em fase precoce do desenvolvimento sobre o músculo esquelético permite a investigação do papel programador da serotonina.

Nos últimos anos, esforços têm se concentrado em busca do entendimento da origem do desenvolvimento das doenças na vida adulta (BARKER, 2004; LAKER et al., 2013). Essa questão foi inicialmente discutida por Barker et al. (1989), que hipotetizaram que insultos em fase precoce da vida, principalmente no período perinatal, resultam em alterações fisiológicas e metabólicas que podem aumentar o risco do desenvolvimento de doenças na vida adulta (KNIGHT; SORENSEN, 2001; BARKER et al., 2002).

A nutrição materna em período perinatal vem sendo estudada como um dos principais fatores capazes de influenciar o desenvolvimento fetal (COTTRELL; OZANNE, 2008; OROZCO-SOLÍS et al., 2010; CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015). O período fetal e pós-natal precoce é caracterizado por intenso crescimento e maturação do organismo, portanto, crítico e vulnerável as condições do ambiente (KNIGHT; SORENSEN, 2001).

Durante a gravidez, uma série de adaptações metabólicas ocorre no organismo materno para adequada manutenção do ambiente em favor do desenvolvimento do feto (WU et al., 2004). Esse período é marcado pelo aumento de demanda de energia e nutrientes (CELI; DI TRANA; CLAPS, 2008). Os mecanismos associados

às alterações no desenvolvimento de um organismo em período crítico, devido a condições do ambiente são conhecidos como um fenômeno de plasticidade fenotípica (KELLY; PANHUIS; STOEHR, 2012). Este conceito abrange a habilidade de um genótipo produzir diferentes fenótipos quando expostos a diferentes ambientes (AGRAWAL, 2001).

Estudos em humanos e em animais mostram que o status nutricional materno em fase de concepção pode influenciar o epigenoma da prole com possível implicação na vida adulta (LAKER et al., 2013; DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014). Em roedores, autores mostraram que variações na dieta materna afeta a metilação do DNA, com consequente implicação no fenótipo em longo prazo (WATERLAND; JIRTLE, 2003). Embora as consequências fenotípicas devido a essas alterações não sejam plenamente conhecidas, o entendimento dos mecanismos envolvidos nas adaptações em diversos tecidos é de fundamental importância.

O consumo excessivo de gordura e calorias faz parte da ingestão diária de grande parte de indivíduos na sociedade ocidental, sobretudo em mulheres com idade reprodutiva, sendo responsável por impactar o sistema de saúde devido às consequências da obesidade e sobrepeso (NELSON; NELSON; FLEMING, 2014; NG *et al.*, 2014). A má nutrição durante período fetal é capaz de causar uma série de alterações fisiológicas no feto (LANGLEY-EVANS et al., 2006). Podendo existir uma relação na pobre qualidade nutricional e doenças em longo prazo (GLUCKMAN; HANSON; PINAL, 2005). Durante o período perinatal, o consumo de dietas rica em gordura é visto por causar restrição do crescimento uterino e baixo peso ao nascer em animais (LIU et al., 2012; CUNHA; MOLLE; PORTELLA, 2015). Estes fatores estão associados ao desenvolvimento de doenças na vida adulta como obesidade, resistência à insulina, hipertensão e doença arterial coronariana (BARKER et al., 2002; BARKER, 2004).

Evidências mostram adaptações estruturais e metabólicas no músculo esquelético devido a ingestão alimentar com excesso de gordura (ABOU MRAD et al., 1992; IZUMIYA et al., 2008; CIAPAITE et al., 2015). O músculo esquelético é um dos maiores tecidos do corpo e possui importante função estrutural e metabólica, além de possuir grande capacidade de adaptação a condições adversas (PETTE; STARON, 2001; BARROS et al., 2009; BISHOP; GRANATA; EYNON, 2014). Uma de suas principais características é em relação às diferentes fibras na sua composição que contribuem

para uma variedade de capacidades funcionais (PETTE; STARON, 2001). Essas fibras diferem em termos de propriedades moleculares, metabólicas, estruturais e contráteis (PETTE; STARON, 2001).

A alta ingestão calórica materna predispõe na prole distúrbios alimentares, aumento da adiposidade e inflamação crônica na vida adulta (GEOGHEGAN et al., 1997; BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007; RAIPURIA; BAHARI; MORRIS, 2015). Ninhadas de ratas obesas também apresentam intolerância à glicose e disfunção muscular (OLIVEIRA et al., 2011; PILEGGI et al., 2016). Além disso é visto que a dieta materna rica em gordura altera a disponibilidade de substrato energético para desempenho das funções do músculo (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007). Filhotes de ratas obesas apresentaram capacidade contrátil reduzida no músculo, sendo essa uma função energético-dependente (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007). É possível que essas alterações estejam associadas com o déficit na sinalização da insulina ou na capacidade mitocondrial (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005). Alteração na distribuição das fibras musculares e mudanças na capacidade oxidativa muscular refletem um estado metabólico prejudicado (SHORTREED et al., 2009). Neste contexto, apesar de existir evidências que mostram a influência do consumo de gorduras sobre o desenvolvimento muscular, os mecanismos pelos quais a má nutrição materna em período perinatal altera a estrutura e funcionamento do músculo esquelético em fase precoce e tardia da vida precisam ser investigados.

Devido à ação como neurotransmissor, a Serotonina (5-HT) possui papel fundamental em etapas do desenvolvimento como proliferação celular, migração, diferenciação e morfogênese na regulação de crescimento do tecido neural, bem como interferir no desenvolvimento de outros sistemas (BUZNIKOV; LAMBERT; LAUDER, 2001). No músculo esquelético, foi encontrado um receptor de serotonina à nível de túbulos-T em miotubos, sugerindo papel da serotonina no processo de excitação e contração muscular e/ou efeito reparador na fibra muscular (GUILLET-DENIAU; BURNOL; GIRARD, 1997). Sendo assim, a manipulação do sistema serotoninérgico durante o desenvolvimento precoce pode impactar funções centrais e periféricas, logo, vem sendo estudada como alvo para o tratamento de obesidade e distúrbios metabólicos (GARFIELD; HEISLER, 2009).

Os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) são a classe de medicamento antidepressivo mais prescrito em mulheres com idade reprodutiva, gestantes e em mulheres em período de amamentação (BERLE; SPIGSET, 2011; FLYNN; BLOW; MARCUS, 2006; DAWSON et al., 2016). Existe preocupação crescente da exposição em crianças de mães tratadas com ISRS durante fase precoce do desenvolvimento (BERLE; SPIGSET, 2011). A manipulação do sistema serotoninérgico com ISRS durante o período de gestação e lactação, apresenta-se como um agente epigenético, podendo levar às alterações morfológicas e funcionais permanentes, inclusive sobre a expressão comportamental (MANHAES DE CASTRO et al., 2001; GRZESKOWIAK; GILBERT; MORRISON, 2012). As alterações relacionadas ao desenvolvimento do feto, bem como dos efeitos em fase precoce da vida precisam ser considerados (GRZESKOWIAK; GILBERT; MORRISON, 2012).

Estudos têm revelado a associação do uso de ISRS com elementos da síndrome metabólica, como alteração nos níveis de colesterol, bem como em efeitos na captação de glicose, alteração do conteúdo de glicogênio e triglicerídeos (SUNMIN; SOO, 2002; RAEDER et al., 2006; BUHL et al., 2010; ROZENBLIT-SUSAN; CHAPNIK; FROY, 2016). Em ratos neonatos a manipulação com ISRS induz a redução de peso, do consumo alimentar, atraso na maturação somática, além de alterações comportamentais, sendo que esses efeitos foram observados mesmo em fase adulta (MANHAES DE CASTRO et al., 2001; DEIRÓ et al., 2004; PINHEIRO et al., 2017).

Em estudo prévio foi mostrado que a exposição neonatal a ISRS causou redução do crescimento do coração com redução na área e perímetro de células cardíacas (TOSCANO et al., 2008). Efeito similar foi observado no músculo esquelético que apresentou redução da área de secção transversa do músculo sóleo e gastrocnêmio em fase precoce e tardia da vida de ratos tratados com fluoxetina durante a lactação (CAIAFFO et al., 2014). Galindo et al. (2015) mostraram que o tratamento com fluoxetina está associado com uma melhor adaptação a uma dieta hipercalórica em ratos adultos, como menor acúmulo de tecido adiposo branco.

Em condições de consumo excessivo de gordura pode ocorrer a supressão de certos tecidos em oxidar esse substrato (UNGER et al., 2010). As alterações moleculares responsáveis por essa ocorrência comprometem a defesa antioxidante de

células musculares (ANDERSON et al., 2009). Foi mostrado que exposição a fluoxetina induz de forma dose dependente uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio alterando a defesa antioxidante (NOVÍO et al., 2011). Entretanto, foi visto que a fluoxetina pode apresentar efeitos protetores através da diminuição do agente oxidante no tecido neuronal, cardíaco e no músculo esquelético (MORETTI et al., 2012; DA SILVA et al., 2014, 2015a; BRAZ et al., 2016).

Embora os efeitos deletérios sobre a prole, mediante exposição à dieta materna rica em gordura em período perinatal, tenham sido expostos na literatura, os mecanismos envolvidos nas adaptações estruturais e metabólicas do músculo esquelético em curto e longo prazo não estão elucidados. Bem como, a forma na qual a exposição à fluoxetina em período neonatal pode programar alterações no músculo esquelético mediante esta influência apresenta-se como potencial objeto de estudo.

Os efeitos do tratamento neonatal com fluoxetina mediante exposição à dieta materna perinatal rica em gordura sobre a tipagem de fibra e atividade enzimática não foi abordado pela comunidade científica até o presente momento. É necessário entender os efeitos dessas influências sobre as adaptações do fenótipo corporal, bem como do tecido muscular, através do conhecimento da alteração da proporção de fibras musculares e alteração da atividade enzimática envolvida no metabolismo oxidativo e/ou glicolítico no músculo esquelético.

Diante do exposto desenvolvemos este estudo sob a hipótese que o tratamento neonatal com fluoxetina mantém a proporção de fibras tipo lenta no músculo esquelético e a atividade enzimática da citrato sintase em ratos expostos à dieta materna perinatal hiperlipídica/hipercalórica. Com isso objetivamos avaliar efeitos do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a tipologia de fibras musculares e atividade enzimática no músculo esquelético de ratos submetidos ou não à dieta materna hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e lactação.

Este estudo produziu dois artigos científicos apresentado como resultado nesse material de dissertação, a saber:

Artigo de revisão sistemática:

Título: "SELECTIVE SEROTONIN REUPTAKE INHIBITORS AFFECTS MORPHOLOGY AND METABOLISM OF SKELETAL MUSCLE IN RODENTS: A SYSTEMATIC REVIEW."

Revista para submissão: *Pharmacological Research*

Área de concentração: Educação Física

Qualis: A2

Fator de Impacto: 4.480

Artigo original:

TÍTULO: "NEONATAL FLUOXETINE ADMINISTRATION ALTERS SKELETAL MUSCLE PHENOTYPE IN RATS EXPOSED TO A HIGH-FAT MATERNAL PERINATAL DIET."

Revista para submissão: *LIFE SCIENCES*

Área de concentração: Educação Física

Qualis: A1

Fator de impacto: 2,936

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O desenvolvimento do músculo esquelético

O desenvolvimento fetal e pós-natal de músculos em mamíferos é marcado por uma série de eventos celulares e bioquímicos sequenciais (KNIGHT; SORENSEN, 2001). O desenvolvimento celular em qualquer sistema é marcado por diversas fases distintas (KAWAUCHI, 2014). Durante o período crítico do desenvolvimento do sistema locomotor, vários fatores são responsáveis por modular etapas do desenvolvimento, dentre eles estímulos ambientais, que podem causar efeitos adversos persistentes (BENNETT; PETTIGREW, 1974; BRAND-SABERI, 2005).

A musculatura esquelética, dentre outras funções, é responsável pela locomoção, postura, movimentos respiratórios, representando grande parte do peso corporal (WHITE et al., 2010; FRONTERA, OCHALA, 2015). Sua principal característica é a propriedade contrátil das suas células multinucleadas, as fibras musculares (GREISING, 2013). Seu metabolismo tem a capacidade de regular-se de forma aguda ou crônica, diante de estado nutricional adverso com adaptações em isoformas de proteína miofibrilar, perfil de enzimas metabólicas e propriedades estruturais e contráteis, além de uma variedade de sinais que contribuem para uma mudança do seu fenótipo (IOSSA et al., 2002; TEPP et al., 2016).

A maior parte do músculo esquelético nos mamíferos é originado a partir dos somitos, em um dos primeiros passos do desenvolvimento (SUMMERBEL; RIGBY, 2000). Os somitos epiteliais diferenciam-se ao longo do eixo dorso ventral do embrião e determina o dermomiótomo, este forma a derme e a musculatura esquelética nos membros (GALLOWAY, 2006). O desenvolvimento da musculatura acontece parte no embrião (miogênese primária) e parte no feto, sendo que nesse último o processo de miogênese secundária é responsável pela maioria dos músculos fetais (SUMMERBEL; RIGBY, 2000; MALTIN et al., 2001). Tais achados favorecem o entendimento da determinação genética básica de algumas células precursoras e uma possível janela para alterar o resultado miogênico por manipulação embrionária precoce (MALTIN et al., 2001).

O processo de formação do músculo esquelético, conhecido como miogênese, envolve as fases de ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas e depende da expressão e atividade dos fatores de regulação

miogênica (FRM) (GALLOWAY, 2006). No período embrionário, sinais oriundos da notocorda e do tubo neural estabelecem o comprometimento das células somíticas do mesoderma com a linhagem miogênica, que irão transformar células não musculares em células com um fenótipo muscular (BRAND-SABERI, 2005). Esse período de diferenciação ocorre pela modulação da expressão dos fatores reguladores intrínsecos MyoD, myf-5, miogenina e MRF4 (GALLOWAY, 2006). Estes fatores ligam-se as sequências de DNA na região promotora de vários genes músculos-específicos, levando a expressão dos mesmos influenciando os eventos da miogênese (DRAEGER; WEEDS; FITZSIMONS, 1987; NAYA, OLSON, 1999).

As células embrionárias com potencial para diferenciação possuem expressão MyoD e myf-5 e são denominados mioblastos (GALLOWAY, 2006). Os mioblastos que expressam Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão de miogenina e MRF4 que regulam a fusão e a diferenciação da fibra muscular (GALLOWAY, 2006). Em seguida os miócitos mononucleados se fundem para formar os miotubos que se separam em primário e secundário, e na fase adulta o músculo esquelético torna-se um tecido estável, caracterizado por fibras musculares multinucleadas primárias e secundárias (DRAEGER; WEEDS; FITZSIMONS, 1987). Estas células apresentam genes específicos que favorecem tradução de proteínas que irão constituir a cadeia pesada de miosina e creatinina quinase (LOWEY, 1969). Os miotubos quando maduros apresentam a característica contrátil do músculo esquelético, sendo assim constituindo o que chamamos de miofibrila (PETTE; STARON, 2001).

Ainda durante o processo de miogênese, alguns dos mioblastos não se diferenciam e permanecem entre a fibra muscular e lâmina basal, sendo denominadas de células satélites (SILVA; CARVALHO, 2007a). Nos mamíferos o crescimento do tecido muscular em período pós-natal, ocorre através do processo de hipertrofia das fibras musculares, onde ocorre um aumento no número de núcleos e miofibrilas nas fibras pré-existentes a partir da proliferação e diferenciação das células satélites (WHITE et al., 2010). Enquanto que o processo de hiperplasia, caracterizado pelo aumento no número de fibras musculares, cessa logo após o período embrionário, em caso de lesão da lâmina basal as células satélites migram para a região da lesão para participar do processo de regeneração muscular (WATT et al., 1987).

O músculo esquelético é de um tecido heterogêneo composto por fibras que diferem em metabolismo, propriedades contráteis e resistência à fadiga. As unidades

funcionais conhecidas como fibras, são caracterizadas por serem cilíndricas, longas e multinucleadas (DRAEGER; WEEDS; FITZSIMONS, 1987; WHITE et al., 2010). São comumente divididas em fibras do tipo I ou fibras de contração lenta, e fibras do tipo II de contração rápida (CORNACHIONE et al., 2011). Músculos que possuem a cadeia pesada de miosina do tipo *Myosin Heavy Chain I* (MHC I) apresentam maior proporção de fibras tipo I, são mais resistentes à fadiga e geralmente estão envolvidos na manutenção da postura (NEUNHÄUSERER et al., 2011). Enquanto que os músculos que apresentam em sua constituição maior quantidade de fibras tipo II, dividem-se basicamente em dois subgrupos de acordo com a cadeia pesada de miosina, sendo MHCIIa e MHCIIb, entretanto, sabe-se que existe em alguns músculos outras isoformas da cadeia pesada de miosina (MHCIIx) (GOSKER et al, 2002; NEUNHÄUSERER et al., 2011).

As fibras tipo I possuem alta capacidade de acumular e utilizar ácidos graxos, muitas mitocôndrias, dependem da fosforilação oxidativa mitocondrial para produzir ATP e possuem capacidade de resistir à fadiga. Enquanto as fibras de contração rápida ou tipo II, acumulam glicose, possuem poucas mitocôndrias, e seu metabolismo energético depende da glicólise (tipo IIb) ou da glicólise e fosforilação oxidativa mitocondrial (tipo IIa ou IIx) para produção de Adenosina Trifosfato (ATP), além de serem facilmente fatigáveis (PETTE, 1971; CORNACHIONE et al., 2011; RUIZ-ROSADO et al., 2013).

O processo de diferenciação e transformação dos vários tipos de fibras é totalmente dependente da presença de inervação, pela demanda metabólica ou disponibilidade de substratos energéticos (BENNETT; PETTIGREW, 1974). Pette e Staron (2001) mostraram que as transições nos tipos de fibra seguem uma sequência que depende da característica fisiológica do músculo. Mas no geral as mudanças nas isoformas da cadeia pesada de miosina seguem uma sequência $MHC I \leftrightarrow MHC IIa \leftrightarrow MHC IIx \leftrightarrow MHC IIb$ (BUTLER-BROWNE; WHALEN, 1984; PETTE; STARON, 2001).

Durante o desenvolvimento fetal e neonatal ocorrem alterações bioquímicas, havendo transição sequencial de isozimas de miosina, sendo o tipo de nervo que inerva a fibra responsável por determinar o teor de miosina nos músculos adultos, estabelecendo o fenótipo durante o desenvolvimento muscular (BUTLER-BROWNE; WHALEN, 1984; BARROS et al., 2009). Em roedores grande parte dos músculos, o

processo de diferenciação torna-se completo ao final da 4ª semana de vida, apresentando um padrão dos tipos I, IIA e IIB que permanece semelhante na vida adulta (BROOKE, 1970).

A composição de fibras no músculo sóleo apresenta um aumento natural na proporção de fibras lentas, que resultam da transformação das fibras IIA (BUTLER-BROWNE; WHALEN, 1984; SOUKUP, ZACHAROVÁ, 2002). Em roedores com cerca noventa dias de idade, o músculo sóleo apresenta cerca de 91% de fibras do tipo I, enquanto que em fase mais tardia de vida esse número de aproxima da totalidade de fibras lentas (SOUKUP; ZACHAROVÁ, 2002). Por outro lado, músculos de características glicolíticas como o Extensor Longo dos Dedos (EDL) apresentam em sua constituição a predominância de fibras tipo IIA e tipo IIB, enquanto o número reduzido de fibras tipo I compõe sua estrutura. Em fase adulta as fibras do tipo IIB constituem cerca de 40% do músculo EDL (SOUKUP; ZACHAROVÁ, 2002).

A identificação das fibras como lenta oxidativa (tipo I), rápidas oxidativas glicolíticas (tipo IIA) e em rápidas glicolíticas (tipo IIB) é possível através de métodos baseados exclusivamente na atividade da Adenosina Trifosfato (ATPase) nas fibras ou associado a análise da atividade enzimática mitocondrial (BROOKE, 1970; PETER, 1972; PETTE; STARON, 2001). As fibras musculares nos mamíferos não diferenciam apenas de acordo com sua composição da cadeia pesada de miosina, mas também devido a suas distintas propriedades fisiológicas e bioquímicas (SCHIAFFINO, 1988; PETTE, 1990) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das fibras musculares

	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Característica	Contração Lenta oxidativa	Contração rápida oxidativa-glicolítica	Contração rápida glicolítica
Taxa de fadiga	Lenta	Intermediária	Rápida
Diâmetro	Pequena	Intermediária	Grande
Concentração de ATPase	Baixa	Alta	Alta
Concentração de mitocôndrias	Alta	Alta	Baixa
Concentração de enzima glicolítica	Baixa	Intermediária	Alta

Fonte: Frontera e Ochala (2015).

As diferentes fibras musculares também podem ser distintas uma das outras através de reações bioquímicas para enzimas do metabolismo oxidativo aeróbio ou de enzimas responsáveis pelo via glicolítica anaeróbia (PETTE, 1971). Diferenças na atividade enzimática podem refletir diferenças no volume mitocondrial bem como da capacidade oxidativa no músculo (SCHWERZMANN et al., 1989). A plasticidade metabólica tem sido amplamente estudada a nível da atividade enzimática em vias aeróbias ou anaeróbias do metabolismo energético (ZAMMIT; NEWSHOLME, 1976; HE; WATKINS; KELLEY, 2001). Portanto, discriminar a atividade de enzimas específicas tem se mostrado um recurso indicador de especialização metabólica no músculo (PETTE, 1971).

Os níveis de discriminação de atividade enzimática podem ser usados para delinear a população de fibras lentas ou rápidas, tais níveis refletem a atividade enzimática de vias glicolíticas (p. ex. lactato desidrogenase) e de vias oxidativas (p. ex. citrato sintase) (TAKASU; HUGHES, 1969; DELP; DUAN, 1996). As fibras tipo I e tipo II podem ser metabolicamente diferenciadas, pois estas contêm distintos padrões de isoenzimas, com predominância da subunidade H nas fibras tipo I e subunidade M

nas fibras tipo II, entretanto, esses padrões não são observados entre as tipo IIA e tipo IIB (PETTE, 1990). Interessante que diferenças metabólicas entre as fibras lentas e rápidas são menos pronunciadas em recém-nascidos, mas aumentam durante o desenvolvimento pós-natal (PETTE, 1990).

O músculo caracterizado por possuir fibras do tipo lentas, apresenta em sua estrutura fibras mais finas, que contém muitas mitocôndrias, uma grande quantidade de enzimas respiratórias, gotículas lipídicas, bem como uma rica quantidade de mioglobina no sarcoplasma o que confere sua cor avermelhada (FRONTERA, W. R., OCHALA, 2015). Todas essas características conferem aos músculos vermelhos uma alta capacidade metabólica aeróbia e uma maior capacidade de oxidar gordura (SCHWERZMANN et al., 1989). As fibras tipo II caracterizam o músculo como de contração rápida e coloração branca, são maiores em diâmetro e contém grandes quantidades de fosforilase, grandes depósitos de glicogênio e enzimas glicolíticas (PETTE, 1990). Nessas fibras a glicólise e produção de lactato são as principais características que denotam o metabolismo anaeróbio (RUIZ-ROSADO et al., 2013).

A citrato sintase é uma enzima relacionada à formação de energia via metabolismo aeróbio, sendo uma importante enzima para indicação do bom funcionamento oxidativo muscular (SHEPHERD; GARLAND, 1969). Esta é uma enzima transferase, que se localiza no interior das células, na matriz mitocondrial, e catalisa a condensação do oxaloacetato e do grupo acetil da acetil coenzima-A (acetil CoA), a primeira fase do ciclo de Krebs (SHEPHERD; GARLAND, 1969; ARIAS-CALDERÓN et al., 2016). Nesta fase, o oxaloacetato reage com acetil CoA e H_2O , produzindo citrato e CoA (SHEPHERD, GARLAND, 1969; ZAMMIT, NEWSHOLME, 1976). Quando o suprimento de energia celular é alto, esta enzima é inibida por quantidades elevadas de ATP, acetil CoA e Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido (NADH) (SHEPHERD; GARLAND, 1969). Esta regulação assegura que o ciclo de Krebs não oxide um excesso de piruvato e acetil CoA quando as concentrações intracelulares de ATP são elevadas (SHEPHERD; GARLAND, 1969). Além disto, a citrato sintase é utilizada como marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas (SCHWERZMANN et al., 1989). Por outro lado a lactato desidrogenase é um excelente marcador de dano muscular (TAKASU; HUGHES, 1969). Esta enzima juntamente com a coenzima NAD^+ catalisa a interconversão de lactato e piruvato (ZAMMIT; NEWSHOLME, 1976).

Dado o papel crucial das mitocôndrias no fornecimento de energia, é comum associar as disfunções mitocondriais com déficits no desempenho muscular e distúrbios metabólicos (FANG et al., 2015). O entendimento dos mecanismos subjacentes envolvidos em patologias como hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo II e obesidade certamente serão relevantes para o desenvolvimento de medidas terapêuticas que sejam capazes de prevenir doenças e distúrbios que influenciam o metabolismo muscular (RITOV et al., 2005). Nesse contexto, é visto que o músculo esquelético possui grande potencial adaptativo, alterando dessa forma seu fenótipo em resposta as influências ambientais. Contudo o período perinatal, que compreende a gestação e lactação, pode significar uma janela para alterações do fenótipo muscular através de adaptações que estão associadas a mudanças estruturais e metabólicas.

2.2 Nutrição e desenvolvimento do músculo esquelético

A alteração do estado nutricional durante o desenvolvimento fetal causa consequências na vida adulta, ou seja, quando um estímulo ocorre em período crítico, sensível e plástico às influências ambientais, ocorrem efeitos permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de diversos órgãos e sistemas (PARLEE; MACDOUGALD, 2014; CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015). A hipótese da origem fetal do desenvolvimento de doenças no adulto foi originalmente formulada na década de 80, onde se buscou o entendimento de como alteração do fenótipo devido a fatores ambientais, atua no início da vida para programar os riscos de aparecimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta (BARKER et al., 1989).

A nutrição materna apresenta-se como um fator chave do crescimento e desenvolvimento fetal (WU et al., 2004). Promover adequada nutrição não apenas implica em bom desenvolvimento fetal, mas também é importante por diminuir o risco de doenças crônicas na vida adulta (WU et al., 2004; OROZCO-SÓLIS et al., 2009; DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014). Os efeitos da nutrição materna sobre a metilação do DNA são estabelecidos em fase precoce do período embrionário e subsequentemente propagados para linhagens de células, ocorrendo variação epigenética interindividual que afeta diversos tipos de células (DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014).

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram associações entre padrões alterados de crescimento como restrição do crescimento uterino, baixo peso ao nascer e parto prematuro, com o aumento do risco de desenvolvimento de hipertensão, intolerância à glicose, resistência à insulina, obesidade e diabetes na vida adulta (LIU et al., 2012; LAKER et al., 2013; DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014; BAACK et al., 2016). A base biológica para essas associações é explicada a partir de dois fenômenos: a plasticidade de desenvolvimento e crescimento compensatório (KELLY; PANHUIS; STOEHR, 2012). A plasticidade do desenvolvimento trata-se de um fenômeno pelo qual o genótipo pode dar origem a uma série de alterações fisiológicas em diversos órgãos afetando a estrutura, metabolismo e função, em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (BARKER, 2004). Enquanto que em mamíferos o crescimento compensatório parece estar relacionado ao aumento da taxa de massa corpórea após um período de privação de alimentos (WILSON; OSBOURN, 1959).

Durante a gravidez a demanda energética é substancialmente maior, sobretudo ao final da gestação, exacerbando as consequências em caso de dieta materna inadequada nesse período (WU et al., 2004). Portanto, o *status* inadequado de macronutrientes durante gestação e lactação pode influenciar o desenvolvimento da prole (MIESE-LOOY; ROLLINGS-SCATTERGOOD; YEUNG, 2008). O consumo de gorduras saturadas deve ser limitado por uma série de razões durante a gravidez, principalmente pela mudança no conteúdo de ácidos graxos essenciais no líquido amniótico e da membrana intestinal do feto (FRIESEN, 2006).

Os ácidos graxos saturados têm recebido atenção pela sua habilidade em influenciar mecanismos pro-inflamatórios através do consumo de dieta hiperlipídica (ENOS et al., 2013). Consistente ativação de vias inflamatórias resulta num estado crônico de inflamação e subsequente resistência à insulina (LEE; ZHAO; HWANG, 2010). A miogênese, adipogênese e fibrogênese de células satélites mesênquimais são controladas pela expressão de um ou mais genes cruciais. Logo a nutrição materna influencia o desenvolvimento muscular fetal através de modificações epigenéticas (REIK, 2007). A modificação da histona pode guiar a metilação do DNA lidando com alterações da expressão gênica (REIK, 2007). Atualmente há a associação entre a inflamação e modificações epigenéticas de genes chave que regulam a miogênese

e adipogênese, provendo um mecanismo adicional entre inflamação e alteração do desenvolvimento muscular (DU et al., 2010).

A alteração da nutrição materna vem sendo amplamente usada para entender os efeitos da plasticidade de desenvolvimento (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007; TOSCANO et al., 2010; KARBASCHI et al., 2017). O desenvolvimento do músculo esquelético é especialmente vulnerável à deficiência de nutrientes (LANGLEY-EVANS et al., 2006; ZHU et al., 2006; TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008). Autores mostraram que a desnutrição materna durante a gestação causa regulação de miostatina na placenta, restringindo o suprimento de nutrientes para o feto, podendo este ser um fator regulador do fenótipo da prole (PEIRIS et al., 2010).

As diferenças das propriedades bioquímicas do músculo com composições diferentes de fibras podem sobressair em resposta metabólica diferencial, alterada pela disponibilidade e composição da dieta materna (BAYOL; JONES; GOLDSPINK, 2003). Tem sido especulado que alterações no crescimento e desenvolvimento de fibras musculares podem ser um dos mecanismos subjacentes à programação de doenças metabólicas (MATSAKAS; PATEL, 2009). Além disso, existe a preocupação dos efeitos da exposição pré, peri e pós natal precoce à condições de má nutrição (DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014; HELLGREN et al., 2014).

A deficiência de nutrientes de forma crônica é capaz de reduzir a massa muscular, com consequente redução área de secção transversa no músculo esquelético (MATSAKAS; PATEL, 2009). No entanto os mecanismos de transição das fibras musculares sob condições nutricionais adversas não estão elucidados, pois maior regulação do fenótipo oxidativo (fibras tipo I e IIA) bem como aumento no número de células glicolíticas do tipo IIB foram reportados em casos de restrição nutricional (BRANDSTETTER; PICARD; GEAY, 1998; ZHU et al., 2006).

Embora seja possível observar mudanças estruturais e metabólicas a curto e longo prazo, sabe-se que o organismo em período crítico do desenvolvimento apresenta maior vulnerabilidade a mudanças devido aos desafios do ambiente (KNIGHT; SORENSEN, 2001). Uma série de evidências em animais tem mostrado que ninhadas de mães que apresentaram condições de restrição nutricional durante a gestação e lactação, apresentaram mesmo em fase tardia da vida alterações estruturais e metabólicas no músculo esquelético (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008; DA SILVA ARAGÃO et al., 2014; LATOUCHE et al., 2014). Redução na massa

muscular, aumento na proporção de fibras tipo IIa no sóleo e redução nas fibras tipo IIb no EDL foram vistas em ninhadas expostas a baixa ingestão de proteínas na dieta das ratas progenitoras (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008; TOSCANO et al., 2010). Na mesma linha um estudo mostrou que a exposição à restrição proteica durante período perinatal alterou em longo prazo as propriedades estruturais e enzimáticas de músculos esqueléticos da prole (ARAGÃO et al., 2014).

Devido ao excessivo consumo de gordura na dieta ocidental, nos últimos anos houve um aumento do foco sobre a associação desta influência durante a gestação e a ocorrência de disfunções metabólicas em fase adulta da prole (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007; HELLGREN et al., 2014). Obesidade materna e consumo excessivo de gordura durante a gestação é apontado como causa do acúmulo de gordura, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia na prole (WALTER; KLAUS, 2014; HUANG et al., 2017). Mesmo os mecanismos não estando elucidados, acredita-se que em parte esta ocorrência se deve a disfunção mitocondrial no músculo esquelético (IOSSA et al., 2002).

Um músculo esquelético saudável é capaz de alterar facilmente o uso entre a glicose e oxidação de gordura em respostas a sinais homeostáticos (BUCKLEY et al., 2005). Este fenômeno é conhecido como flexibilidade metabólica (BUCKLEY *et al.*, 2005). Em um estudo, autores mostraram que em curto prazo o consumo de 45% de gorduras a mais na dieta, muda a transcrição muscular em camundongos, promovendo maior tipo de fibras oxidativas (DE WILDE et al., 2007). Por outro lado, de forma crônica a ocorrência de obesidade pode apresentar aumento na proporção de fibras rápidas e redução nas fibras lentas comparado com controle que possui fenótipo magro (TANNER et al., 2002).

A dieta materna rica em gordura causa uma significativa influência na regulação, expressão e função do complexo respiratório do sistema de transporte de elétrons mitocondrial no músculo esquelético das ninhadas (PILEGGI et al., 2016). Nesse estudo os autores mostraram diminuição nos fatores transcricionais mitocondriais além da menor coordenação na expressão gênica em subunidades do complexo respiratório do sistema de transporte de elétrons mitocondrial no músculo esquelético das ninhadas expostas dieta materna com 45% kcal proveniente da adição de gordura (PILEGGI et al., 2016).

Alterações na estrutura e função da capacidade oxidativa na mitocôndria do músculo esquelético relacionam-se com distúrbios na respiração mitocondrial sendo este fator presente no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo II (KELLEY, 2002). A expressão gênica que codifica o complexo respiratório do sistema de transporte de elétrons mitocondrial no músculo está sujeita à regulação a fatores de transcrição gênica como o Coativador Alfa do receptor Gama ativado por Proliferador de peroxissoma (PGC1 α). Interessante que o PGC1 α está reduzido no músculo de indivíduos obesos e com diabetes tipo II (MOOTHA, 2003; CRUNKHORN et al., 2007).

Outra forma da função do músculo esquelético sofrer alterações em fase precoce do desenvolvimento é através do metabolismo lipídico (HELLGREN et al., 2014). Aumentos prolongados no fluxo de ácidos graxos no tecido muscular podem resultar em aumento no conteúdo de ácidos graxos como cadeias pesadas de acil CoA, diacilglicerol e triacilglicerol no músculo EDL de camundongos adultos (CIAPAITE et al., 2015). Há evidências que estes interferem na sinalização da insulina (BUCKLEY et al., 2005). Os filhotes de ratos alimentados com uma dieta hipercalórica durante a gestação e lactação apresentam desenvolvimento muscular comprometido apresentando alteração no processo de transição das fibras musculares, energia muscular reduzida e maior acúmulo de gordura intramuscular (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005). A obesidade materna é associada a desregulação do desenvolvimento e da função metabólica do músculo esquelético da ninhada devido alteração da sinalização da insulina (RAIPURIA; BAHARI; MORRIS, 2015). As alterações na estrutura tecidual e em sua bioenergética mitocondrial afetam o desempenho do sistema músculo esquelético causando alterações nas vias de transferência de energia (DU et al., 2010). As mudanças permanentes na regulação homeostática destes sistemas aumentam o risco de desenvolver doenças, principalmente quando estes são impostos a fatores de riscos em período crítico do desenvolvimento (PARLEE; MACDOUGALD, 2014).

2.3 Manipulações do sistema serotoninérgico e plasticidade do desenvolvimento

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor monoaminérgico sintetizado no núcleo da rafe do tronco cerebral com atividades que modulam funções centrais e periféricas (WALTHER, 2003). A maior parte da serotonina do corpo é produzida pela

enzima Triptofano Hidroxilase (TPH) que é a enzima limitante da velocidade na sua biossíntese (WALTHER, 2003). A TPH é conhecida por duas isoformas, TPH1 e TPH2. A TPH1 está presente principalmente na glândula pineal, baço, timo, entre outros. A TPH2 é expressa em células neuronais, tais como, o núcleo da Rafe no tronco cerebral (WALTHER, 2003).

A serotonina desempenha importante papel em fase precoce do desenvolvimento, agindo como fator de crescimento, regulando o desenvolvimento propriamente dito, como divisão celular, diferenciação, migração, mielinização e sinaptogênese (BUZNIKOV; LAMBERT; LAUDER, 2001). No cérebro maduro a ação como neurotransmissor regula a cognição, atenção, sono além de importante papel no controle do equilíbrio energético (LESCH; WAIDER, 2012; DONOVAN; TECOTT; HORVATH, 2013).

A regulação do balanço energético é uma das principais funções da 5-HT, sendo necessária para tal fim uma série de adaptações fisiológicas e comportamentais para obter energia, metabolizá-la e realizar o armazenamento (NAMKUNG; KIM; PARK, 2015). Essas alterações são devidas aos sinais sobre estado nutricional e nível de energia proveniente da periferia, integrados nos neurônios que expressam o neuropeptídeo Propiomelanocortina (POMC), localizado no núcleo arqueado do hipotálamo (LESCH; WAIDER, 2012).

A serotonina atua nos receptores através de proteínas transportadoras localizadas nas membranas de neurônios pré-sinápticos (ANDERSON, 2004). Acredita-se que a 5-HT pode participar no controle da alimentação em mamíferos (HESKETH et al., 2005; HALFORD et al., 2007). Tem sido relatado que a 5-HT possui um efeito supressor sobre a ingestão de alimentos e tende a diminuir o ganho de peso corporal (LEIBOWITZ; ALEXANDER, 1998). Os sinais do estado nutricional e do nível energético do organismo são integrados no Sistema Nervoso Central (SNC) para que seja mantida a homeostase energética, alterando a ingestão alimentar (BLUNDELL, 1986).

No sistema nervoso central cerca de 2% da 5-HT é armazenada (WALTHER, 2003). Por outro lado a 5-HT periférica vem sendo intenso objeto de estudo, referente a composição corporal e ao metabolismo lipídico, pois, acredita-se que cerca de 98% de 5-HT disponível no corpo esteja na periferia (NAMKUNG; KIM; PARK, 2015). Em condições fisiológicas normais a elevação nos níveis de 5-HT no hipotálamo desencadeia saciedade, enquanto sua redução promove hiperfagia (HALFORD et al., 2007).

Em camundongos que apresentaram deficiência de TPH1, os mecanismos que protegem contra a obesidade e resistência à insulina ocorrem através do aumento do gasto energético no tecido adiposo marrom após consumo de dieta rica em gordura (CRANE et al., 2015). Crane et al. (2015) sugeriram que a 5-HT pode ser um fator chave no que diz respeito ao metabolismo da glicose, metabolismo lipídico, a acúmulo de gordura e a obesidade, não apenas pelo SNC, mas também pela periferia.

Estudos recentes demonstraram que ratos transgênicos a expressão PGC-1 α induziu maior expressão de genes da fosforilação oxidativa regulando a biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos (MOOTHA, 2003). Adicionalmente a 5-HT controla a biogênese mitocondrial pelo aumento na atividade do promotor PGC-1 α através dos receptores de serotonina em células tubulares proximais do rim, como 5-HT2B (RASBACH et al., 2010). Por outro lado a expressão PGC-1 α pode mediar o processo de diferenciação das fibras musculares (MOOTHA, 2003).

Autores identificaram em mioblastos do músculo esquelético de ratos um receptor funcional 5-HT2A (GUILLET-DENIAU; GIRARD, 1997). Este receptor foi encontrado na membrana plasmática nos mioblastos e ao nível dos túbulos-T em miotubos contráteis (GUILLET-DENIAU; GIRARD, 1997). Foi visto que este receptor é responsável por aumentar a expressão de fatores transcricionais de miogenina envolvidos na diferenciação miogênica (GUILLET-DENIAU; GIRARD, 1997). A ação da 5-HT envolve a inibição primária da degradação proteica, resultando em uma menor disponibilidade de substratos de aminoácidos precursores, para conversão em alanina e glutamina, indicando que a serotonina pode ter efeitos diretos no metabolismo do músculo esquelético (GARBER, 1977).

Em um estudo autores mostraram que o excesso de triptofano na dieta de ratas gestantes causou alterações histológicas nas fibras musculares dos filhotes em fase pós-natal, demonstrando características de atraso na maturação do tecido (MUSUMECI et al., 2014). Por outro lado, a injeção intraperitoneal 1mg de 5-HT em camundongos inibiu o ganho de peso corporal, a hiperglicemia e a resistência à insulina, além de aumentar o gasto energético, o consumo de oxigênio e alteração no perfil de fibras musculares rápidas/glicolíticas para lentas/oxidativas no músculo sóleo (WATANABE et al., 2016). Com isso os autores concluíram que a serotonina periférica pode desempenhar papel no alívio em distúrbios metabólicos como a obesidade, acelerando o consumo de energia no músculo esquelético (WATANABE et al., 2016).

Alteração nos níveis de sinalização da serotonina é vista como fator chave no desenvolvimento de desordens neuropsiquiátricas, também se observa alterações em distúrbios metabólicos (WURTMAN; WURTMAN, 1995; RIVERA; CHRISTIANSEN; SULLIVAN, 2015). Essa preocupação é realçada pelo aumento no uso de antidepressivos como os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS), em mulheres com idade reprodutiva, ou durante período gestacional e lactacional (ANDRADE et al., 2008; BERLE; SPIGSET, 2011). A manipulação do sistema serotoninérgico em fase precoce da vida como o período pré-natal ou neonatal através da exposição de ISRS pode acarretar atraso de neurodesenvolvimento, no entanto, esta pode programar o estado metabólico em fase adulta (KUMMET et al., 2012; KINAST et al., 2013). Alguns antidepressivos apresentam-se como agente epigenéticos por reduzir o promotor da metilação do DNA em astrócitos primários de ratos, possivelmente pela redução da atividade da DNA metiltransferase 1 (ZIMMERMANN et al., 2012).

Os ISRS vêm sendo comumente utilizados por exercer efeitos terapêuticos por aumentar a concentração extracelular de serotonina ao inibir sua recaptação pelo neurônio pré-sináptico, aumento a disponibilidade para se ligar ao receptor pós sináptico (LEONARD et al., 1997). Entretanto, isto altera a fisiologia em diversos sistemas do corpo, devido a maior estimulação dos receptores pós-sinápticos (QU et al., 2009; POGLIANI et al., 2017). Os transportadores de serotonina (SERT) são reguladores chaves da neurotransmissão e principal alvo dos antidepressivos (CHEN et al., 2012). Essa classe de medicamento se tornou importante no tratamento da depressão, devido a sua eficácia, tolerabilidade e segurança relativa (KRENTZ; FUJIOKA; HOMPESCH, 2016). A fluoxetina foi descrita na literatura pela primeira vez em 1974, como um inibidor seletivo de absorção de serotonina, sendo este o principal mecanismo de ação da fluoxetina, um agente farmacológico que tem sido utilizado para influenciar os processos de neurotransmissão do sistema nervoso central (MANDRIOLI; FORTI; RAGGI, 2006).

Os ISRS mostraram efetividade no tratamento de outros transtornos psiquiátricos, em modelos de depressão, distúrbio obsessivo compulsivo, restrição alimentar, bulimia nervosa, dentre outros (ANDERSON, 2004). Em ratos a fluoxetina foi capaz de diminuir a ingestão alimentar e potencializou o efeito anorético da 5-HT (HESKETH et al., 2005). A aplicação direta de fluoxetina no núcleo paraventricular no hipotálamo

suprimiu significativamente a ingestão de carboidratos, mas não de proteínas ou gordura (LEIBOWITZ; ALEXANDER, 1998).

A vulnerabilidade de um organismo durante período crítico de desenvolvimento em relação a estímulos ambientais, a exemplo a exposição precoce de ISRS, pode afetar de forma permanente regiões do sistema nervoso e no músculo esquelético responsável pelo equilíbrio energético na vida adulta (CASPER et al., 2011; DOOSTI et al., 2013; GLAZOVA et al., 2014). Crescente número de evidências vem utilizando a manipulação com ISRS em período precoce pós-natal, visando programar fenótipos em longo prazo e determinar os efeitos da exposição neonatal, associando os níveis de serotonina em fase precoce da vida com alterações morfológicas, metabólicas e comportamentais (MANHÃES-DE-CASTRO, 2001; TOSCANO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2017). A exposição com ISRS durante o desenvolvimento pode causar alterações que afetam os mecanismos celulares e moleculares associados com a plasticidade de desenvolvimento (KRISHNAN, VAISHNAV; NESTLER, 1986).

Em um estudo os autores verificaram diferenças no peso corporal, no peso do coração, área transversal e perímetro cardíaco entre grupos nutridos e desnutridos em diferentes idades (TOSCANO et al., 2008). Os animais desnutridos apresentaram mudanças na morfologia cardíaca. No entanto, animais desnutridos que realizaram aplicação de fluoxetina não apresentaram as mesmas alterações (TOSCANO et al., 2008). Adicionalmente, o tratamento neonatal com fluoxetina pode causar alterações nos componentes serotoninérgicos, podendo esta ocorrência ser responsável por perturbar o efeito inibitório da ação da serotonina sobre ingestão alimentar (PINHEIRO et al., 2017). Além disso, estudos prévios mostraram a associação entre a exposição neonatal com ISRS na redução da agressão intraespecífica, atraso no crescimento, atraso na ontogenia dos reflexos e redução no número de neurônios serotoninérgicos (MANHAES DE CASTRO et al., 2001 DEIRÓ et al., 2006).

A literatura tem mostrado que em condições de má nutrição, a manipulação do sistema serotoninérgico, pode acarretar em disfunções em diversos sistemas como disfunção cardíaca (NASCIMENTO et al., 2014). Associado a essas condições de má nutrição em período crítico do desenvolvimento, a disfunção mitocondrial com elevados níveis de estresse oxidativo parece afetar a defesa antioxidante no tronco encefálico de ratos adultos (FERREIRA et al., 2016). Na mesma linha autores sugeriram que a administração precoce com ISRS, como a fluoxetina, pode ajudar a diminuir a

incidência e severidade de doenças metabólicas, sendo possível melhorar disfunção mitocondrial e reduzir agressões em tecidos do sistema nervoso, ou mesmo no músculo esquelético (DA SILVA et al., 2015).

O músculo esquelético é um tecido que possui importante função estrutural e metabólica (MALTIN et al., 2001), contudo, o envolvimento da plasticidade do músculo esquelético sobre condições anormais de nutrição materna, por consumo de gorduras, durante o desenvolvimento da prole, pode ter participação no desenvolvimento de distúrbios metabólicos na vida adulta (BARKER, 2004; MATSAKAS; PATEL, 2009; CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015). Considerando que o período pós-natal precoce apresenta-se como uma janela crítica para determinar a saúde metabólica em longo prazo (PLAGEMANN et al., 2012), experimentos com a manipulação do sistema serotoninérgico com ISRS foram realizados e resultaram em mudanças de diversos mecanismos metabólicos e estruturais no músculo esquelético de roedores e humanos (BUHL et al., 2010; CAIAFFO et al., 2014; LEECH; KINNAIRD; HORNBY, 2014) como redução no conteúdo de lipídios em células musculares (ROZENBLIT-SUSAN; CHAPNIK; FROY, 2016), aumento da captação de glicose (SUNMIN; SOO, 2002) e da respiração mitocondrial (DA SILVA et al., 2015), além de reduzir a área de secção transversa no músculo (CAIAFFO et al., 2014). Dado a essas condições especulamos que em condições adversas os efeitos da exposição precoce a ISRS pode trazer repercussões que diminuam a severidade das agressões nutricionais em período crítico do desenvolvimento no sistema músculo esquelético, podendo os efeitos de programação serem observados em fase tardia de vida.

3 HIPOTHESES

O tratamento neonatal com fluoxetina mantém a proporção de fibras tipo lenta no músculo esquelético e a atividade enzimática da citrato sintase em ratos expostos à dieta materna perinatal hiperlipídica/hipercalórica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar em curto e longo prazo os efeitos do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a proporção de fibras musculares e atividade enzimática no músculo esquelético de ratos submetidos ou não à dieta materna hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e lactação.

4.2 Objetivos Específicos

Nas ratas gestantes/lactantes avaliar:

- O consumo alimentar semanal;
- O peso corporal.

Na prole avaliar:

- As características murinométricas: peso, circunferência abdominal, circunferência torácica, comprimento naso-anal (a cada dois dias e nas idades alvos);
- O consumo alimentar nos últimos cinco dias das idades alvo;
- A resposta glicêmica durante a realização dos testes de tolerância à glicose e à insulina;
- A proporção das fibras musculares do músculo sóleo e músculo extensor longo dos dedos aos 30 e 90 dias;
- A atividade enzimática da citrato sintase e do lactato desidrogenase aos 30 e 90 dias no músculo sóleo e músculo extensor longo dos dedos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e condições experimentais

Ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE, foram mantidos no Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE desde

o período de adaptação até o final dos experimentos. Os ratos foram alojados em condições padrão de biotério invertido (temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas, escuro: 08h00min às 20h00min / claro: 20h00min às 08h00minh), livre acesso à água e a ração. O manejo e os cuidados seguiram as recomendações da “Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA” (CONCEA, 2013) o estudo teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE sobre o número 0027/2016 (ANEXO 1).

5.2 Grupos experimentais

Ratas nulíparas com idade entre 90 e 120 dias de vida, pesando cerca de 220-250 gramas, em período estral foram acasaladas numa proporção de duas fêmeas ($n=20$) para um macho ($n=10$). Após confirmação da gestação, as ratas gestantes foram alocadas em gaiolas individuais para constituir dois grupos experimentais segundo manipulação dietética, a partir do primeiro dia de prenhez:

- Normolipídico/Normocalórico (NN, 354,65 Kcal/100g de dieta, $n=10$);
- Hiperlipídico/Hipercalórico (HH, 483, 93 Kcal/100g de dieta, $n=10$).

As mães do grupo NN receberam dieta padrão de biotério (Presence®), denominada dieta controle. As mães do grupo H receberam uma mistura de ração padrão de biotério triturada e banha de porco (Sadia®), rica em gorduras saturadas, denominada dieta hiperlipídica/hipercalórica (HH) (Tabelas 1 e 2). A dieta HH foi confeccionada no departamento de Nutrição da UFPE. Assim sendo, as progenitoras foram submetidas às dietas desde o primeiro dia de gestação até o fim do período de amamentação 21º dia pós-natal (DPN). O desmame dos filhotes ocorreu ao 22º DPN, em seguida, todos os animais receberam dieta padrão do biotério.

Tabela 2. Ingredientes utilizados na confecção da dieta hiperlipídica/hipercalórica

Ingredientes	Quantidade (%)
Ração comercial (Presence®)	76
Banha de porco (Sadia®)	24

Fonte: O Autor.

Tabela 3. Composição centesimal das dietas controle e hiperlipídica/hipercalórica

Macronutrientes	Dieta Controle (g/100g)	Dieta Hiperlipídica/Hipercalórica (g/100g)
Proteínas	25,51	18,17
Carboidratos	53,59	40,69
Lipídeos	4,25	27,61
Cinzas	7,6	5,39
Umidade	9,05	8,14
Kcal/100g	354,65	483,93

Fonte: O autor.

5.3 Tratamento farmacológico e controle

Cada grupo foi composto por filhotes machos que foram tratados com fluoxetina (F) (10mg/Kg; 1µl/g). A droga foi obtida a partir de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA) e diluída em solução salina (1mg/ml). O outro grupo recebeu solução salina (S) (NaCl 0,9%, 10 ml/Kg). A manipulação foi feita por via subcutânea diariamente, do 1º ao 21º dia de lactação, após o início do ciclo escuro devido ao maior pico de liberação de serotonina, como previamente descrito (SÁNCHEZ et al., 2008; DA SILVA et al., 2015).

Ao final foram formados os seguintes grupos (Figura 1):

- Normonutrido salina (NS): filhotes normonutridos e tratados com salina (S) durante a lactação com 30 dias (n=8) e com 90 dias (n=8).
- Normonutrido fluoxetina (NF): filhotes normonutridos e tratados com fluoxetina (F) durante a lactação com 30 dias (n=8) e com 90 dias (n=8).
- Hiperlipídico/hipercalórico salina (HS): filhotes submetidos à dieta hiperlipídica/hipercalórica (H) e tratados com solução salina (S) durante a lactação com 30 dias (n=8) e com 90 dias (n=8).
- Hiperlipídico/hipercalórico fluoxetina (HF): filhotes submetidos à dieta hiperlipídica/hipercalórica (H) e tratados com fluoxetina (F) durante a lactação com 30 dias (n=8) e com 90 dias (n=8).

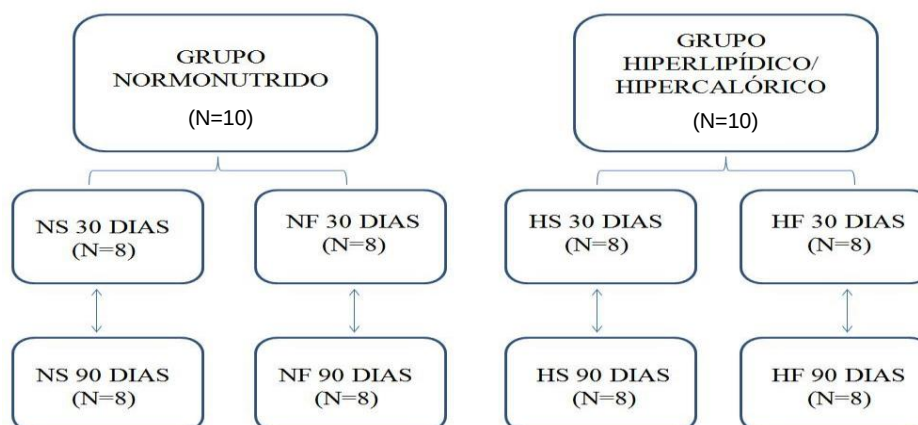


Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais. Grupo NN= normolipídico/normocalórico compostos por ratas que consumiram dieta padrão durante a gestação e lactação. Grupo Hiperlipídico/hipercalórico composto por ratas que consumiram dieta hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e lactação. Grupos filhotes de acordo com a exposição a dieta materna, manipulação farmacológica e idade 30 ou 90 dias, sendo: Normolipídico/normocalórico + Salina (NS); normolipídico/normocalórico + Fluoxetina (NF); Hiperlipídico/hipercalórico + Salina (HS); Hiperlipídico/hipercalórico + Fluoxetina (HF).

Desde o desmame até o dia do sacrifício, os ratos foram mantidos em caixas coletivas contendo no máximo quatro animais sob condições padrão de biotério, com água e dieta padrão *ad libitum*. No 30º e 90º dias de vida, os animais foram sacrificados por decapitação para retirada dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) da pata direita, para análise da tipologia das fibras musculares e da pata esquerda para análise da atividade enzimática.

5.4 Características murinométricas

O peso corporal das ratas gestantes foi avaliado a partir do diagnóstico de prenhez até o 21º dia de lactação a cada sete dias. Os pesos corporais dos filhotes foram registrados diariamente no início do ciclo escuro. Para avaliação desses dados foi utilizada uma balança eletrônica digital MARTE® (Modelo ASF11). Os comprimentos naso-anal foram medidos sobre um papel milimétrico, com precisão de 1 mm a cada dois dias. Também foram medidos os valores de circunferência abdominal e torácica através de uma fita métrica inelástica com precisão de 0,01 mm a cada dois dias até o desmame. As avaliações foram repetidas no 30º, 60º e 90º dias. Nos filhotes foi realizada a análise do ganho de peso através da fórmula $GP \% = \frac{[\text{peso final (g)} \times 100 / \text{peso inicial (g)}] - 100}{\text{CADENA-BURBANO et al., 2017}}$.

5.5 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar das ratas foi avaliado a partir do primeiro dia após diagnóstico da prenhez, semanalmente, até o final do período da lactação e foi dado pela diferença entre oferta e rejeito em gramas. Ao desmame os ratos filhotes foram alocados em gaiolas individuais na última semana antes das idades de 30, 60 e 90 dias de idade com livre acesso a ração padrão e água. Foi considerado o consumo alimentar de cinco dias antes das idades alvos pela diferença entre oferta e rejeito diário em gramas. Uma balança eletrônica MARTE® (Modelo ASF11) com precisão de 0,001 g foi utilizada para as pesagens de ração.

5.6 Testes de Tolerância à glicose e à insulina

Para a realização do Teste de Tolerância à Glicose, os animais no 80º dia foram submetidos a 12 horas de jejum. Após a avaliação do peso corporal dos animais, amostras de sangue foram obtidas da veia caudal para análise imediata com glicosímetro Accu-check Active® e tiras para os testes (Roche Mannheim, Germany). Em seguida foi administrada 1g/kg de glicose a 50% por via intraperitoneal e as mensurações com glicosímetro repetidas aos 15, 30, 60 e 120 minutos pós-aplicação de glicose. Dados da glicemia foram expressos em mmol/L, sendo avaliada a resposta do TTG pela área sobre a curva. Para o teste de Tolerância à Insulina (TTI) os procedimentos foram repetidos no 83º dia de vida. A insulina foi administrada por via intraperitoneal com dosagem de 0,75 U/Kg.

5.7 Coleta de amostra muscular

Aos 30 e 90 dias de idade, de acordo com a alocação nos grupos, os animais foram sacrificados por decapitação para retirada do músculo sóleo e músculo extensor longo dos dedos (EDL). Assim, a partir de uma incisão longitudinal na face lateral da pata posterior, os músculos sóleo e EDL da pata esquerda foram seccionados no tendão, dissecados e imediatamente congelados em gelo seco e em seguida, as amostras foram armazenadas -80 °C, até a realização das análises de atividade enzimática. O músculo sóleo e EDL da pata direita foram seccionados no tendão e dissecados, e foram pesados e congelados por imersão em n-Hexano resfriado com gelo-seco e armazenados em -80 °C, até o dia das análises de tipagem de fibras. Para pesagem

das amostras musculares foram utilizadas uma balança MARTE® com precisão de 0,0001 g .

5.8 Análises das proporções de fibras musculares

As amostras musculares foram fixadas perpendicularmente no suporte do criostato com resina Tissue Tek OCT – Optimal Critical Temperature Compound. As seções transversais (10µm) foram cortadas com um criostato mantidas a -20°C e coradas pela técnica ATPase miofibrilar (BROOKE, 1970). Os cortes foram mantidos à temperatura ambiente. Inicialmente as amostras foram pré-incubadas por 20 minutos em uma solução ácida pH 4.3 para diferenciação das fibras tipo I e II e pré-incubação em pH 4.55 para identificação dos subtipos IIA e IIB, com subsequente incubação em pH 9.4.

Os cortes transversais do músculo foram pré-incubados em temperatura ambiente por 20 minutos em solução contendo 140mM de ácido acético e 60mM de acetato de sódio com pH ajustados em 4.3 e 4.55. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas a 37°C contendo, 20 mM de CaCl₂, 20 mM de barbital sódico, 2,5 mM de sal de ATP em 40 mM de glicina tamponada (pH 9,4). Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada, seguida de imersão em cloreto de cobalto a 2% por 3 minutos, em seguida revelados em sulfeto de amônio a 1,5% por 3 minutos, lavados em água destilada, desidratados em uma bateria crescente de alcoóis (70-100%). Por fim foram imersas duas vezes em tolueno e colocadas para secagem em temperatura ambiente. Após a secagem as lâminas foram recobertas por lamínulas utilizando resina Entellan.

Os cortes foram analisados com um microscópio (Olympus Optical U-CMAD-2, Tokyo, Japan; objetiva 10x), conectado a um computador (TV TUNER APPLICATION - TelSignal Company Limited, Taiwan, AnalysisGet). As imagens das seções histológicas superficiais dos músculos sóleo e EDL foram capturadas para posterior análise da proporção de fibras. As fibras musculares foram coradas com relação aos três tipos principais de fibras (I, IIA, IIB), com base nas diferenças da intensidade da coloração por ATPase após a pré-incubação ácida (pH 4,3 e 4,55) Conforme as diferentes intensidades de coloração, a seguinte classificação será usada para o músculo sóleo e músculo EDL: pH 4,3 (tipo I, mais escura e tipo II, mais clara) e pH 4,55 (tipo I, mais escura; tipo IIA, mais clara; e, tipo IIB, cinza). Para contagem das células e

análise da proporção de fibras foi utilizado o software Mensurim pro 6.0 (Jean-François Madre-Amiens, França).

5.9 Análise da atividade enzimática

Para a análise enzimática, foi feita a homogeneização individual do músculo sóleo e músculo extensor longo dos dedos. Para a mensuração da atividade da citrato sintase metade do músculo foi homogeneizado com tampão de extração contendo Tris base 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, e um coquetel de inibidores de fosfatases e proteases (Ortovonadato 100 mM, PMSF 1 mM e Nonidet 1%) e centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado para a determinação da proteína, realizada pelo método de Bradford, utilizando como padrão albumina bovina (BSA, 1 mg/ml) (BRADFORD, 1976). A dosagem enzimática da citrato sintase no músculo sóleo e EDL foi determinada através de ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro, segundo método descrito por Zammit e Newsholme (1976). A atividade foi medida a partir da quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) liberada com o DTNB do meio e oxaloacetato 10mM. Para o tampão utilizou-se Tris-HCl 50mM (pH 8,1), EDTA 1 mM. O tampão de ensaio consistiu na adição do DTNB 1mM ao tampão Tris-HCl (pH 8,1) + Triton X-100 1% (v/v). A reação deu-se com a adição de oxaloacetato 10mM ao tampão previamente incubado com a amostra (300 µg) a 25°C. O volume total do ensaio foi de 1 ml e a leitura foi realizada durante um intervalo de 160 segundos, em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em U/mg proteína/minuto.

Para a dosagem da lactato desidrogenase, utilizou-se tampão de ensaio contendo 50mM-Fosfato de potássio pH 7,4 e 25 °C, 6mM de NADH e 23 mM de piruvato de sódio (ambos diluídos em buffered water- tampão fosfato de potássio diluído em água destilada na razão 1:10) e adicionado aproximadamente 200µg da amostra. O volume do ensaio foi de 2ml e o pH de 7.3. O volume total do ensaio foi de 1 ml e a leitura foi realizada durante um intervalo de 60 segundos, em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol/mg proteína/minuto (REEVES et al., 1963).

6 Classificações das Variáveis

6.1 Variáveis Independentes

- De interesse: Estado nutricional dos animais (Dieta Padrão e dieta Hiperlipídica/Hiperclórica) e aplicação de Droga ou solução salina. Variáveis categóricas nominais;
- De controle (Idade e peso corporal das gestantes e sexo dos filhotes). Variável quantitativa contínua racional.

6.2 Variáveis Dependentes

- Peso corporal das ratas em período de gestação e lactação variável quantitativa contínua dada em gramas.
- Características fenotípicas dos animais peso, comprimento naso-anal, circunferência abdominal e torácica variável quantitativa contínua dada em gramas e em centímetros;
- Avaliação do consumo alimentar das ratas e filhotes, dada pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e quantidade de ração consumida: variável quantitativa contínua dada em gramas;
- Avaliação do índice glicêmico no teste de tolerância à glicose e tolerância à insulina: variável quantitativa contínua dada em mg/dl;
- Tipos de fibras musculares categorizadas em tipo I e tipo IIa, tipo IIb: variável categórica nominal dada em porcentagem;
- Análise da atividade enzimática: expressão da citrato sintase e lactato desidrogenase variável quantitativa contínua dada em U/mg e em mM/mg respectivamente.

7 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software GraphPad 7® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) e expressos em média e erro padrão da média. Foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os grupos de variáveis expressas ao longo do tempo foi utilizado o teste ANOVA *two-way* para medidas repetidas seguidas pelo teste de Tukey. Para comparação entre os grupos foram utilizados o teste t-student e o teste ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Tukey. Para os dados que não apresentaram normalidade foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

8 RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados em forma de artigo original.

Artigo original:

TÍTULO: NEONATAL FLUOXETINE ADMINISTRATION ALTERS SKELETAL MUSCLE PHENOTYPE IN RATS EXPOSED TO A HIGH-FAT MATERNAL PERINATAL DIET.

Este artigo (APÊNDICE B) foi elaborado segundo os objetivos, metodologias e resultados do presente estudo e será submetido à Revista *Life Sciences* (qualis A1 para a área 21 da CAPES, fator de impacto 2,936).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A má nutrição durante a gestação e lactação através do consumo de uma dieta hiperlipídica e hipercalórica causou redução de peso corporal nas ratas nutrízes. Essa redução ocorreu apesar de não ter sido observado diferença na ingestão calórica, quando comparado às ratas que consumiram a dieta controle.

Esta agressão nutricional em período crítico do desenvolvimento causou nos filhotes expostos efeitos no fenótipo corporal e muscular em fase precoce (redução do peso muscular, aumento de fibras oxidativas e redução da atividade da LDH no sóleo e redução de fibras tipo IIB e da atividade da LDH no EDL aos 30 dias) e fase tardia da vida (redução da CS no músculo EDL).

O tratamento neonatal com fluoxetina em filhotes expostos a dieta materna perinatal rica em gordura provocou redução de peso, consumo alimentar e no crescimento da prole, com efeitos observados em fase adulta da vida. No músculo EDL, aumentou a proporção de fibras oxidativas tipo I e tipo IIA associado ao aumento da atividade da CS. Interessante que os 90 dias os filhotes expostos a dieta materna perinatal Hiperlipídica/Hipercalórica e que receberam administração neonatal com fluoxetina mantiveram a proporção de fibras lenta oxidativas e fibras rápidas glicolíticas-oxidativas, refletindo na manutenção da capacidade oxidativa no EDL pelo aumento da citrato sintase observada nesses animais.

O músculo esquelético por ser um tecido maleável as condições do ambiente, apresentou alteração estrutural e metabólica mediante alteração do estado nutricional materno, bem como devido à manipulação com fluoxetina em período neonatal. As consequências observadas em fase adulta reforçam a hipótese que as adaptações necessárias à sobrevivência em período crítico do desenvolvimento podem relacionar-se com a homeostase prejudicada em fase tardia da vida. Aqui vimos que o músculo esquelético alterou a proporção de fibras em respostas as influências em período crítico do desenvolvimento, influenciando na capacidade metabólica muscular.

Embora se saiba que a fluoxetina causa consequências no desenvolvimento, em indivíduos com desordens metabólicas esta parece exercer papel na manutenção a longo prazo do consumo alimentar, do peso corporal e do fenótipo muscular de filhotes expostos a condições anormais de nutrição em fase precoce da vida como o consumo materno de dieta hiperlipídica em período perinatal. Entretanto os mecanismos do desenvolvimento de fenótipo alterado em resposta a condições adversas do ambiente precisam ser entendidos, bem como a busca por estratégias de intervenção que possam diminuir o impacto estrutural e metabólico no músculo necessitam de atenção.

10 PERSPECTIVAS

O presente estudo suscitou o interesse para investigações futuras como:

- Estudar os efeitos pela manipulação nutricional com dietas hiperlipídicas em período pré concepcional nas ratas nutrízes;
- Avaliar de forma qualitativa e quantitativa o leite materno de ratas alimentadas com dietas hiperlipídicas;
- Avaliar os efeitos da exposição a dieta materna hiperlipídica e hipercalórica sobre a estrutura e fisiologia do músculo esquelético em fase mais tardia de vida;
- Avaliar parâmetros do tecido adiposo e a análise do conteúdo intramuscular de gordura sobre influência da manipulação neonatal com fluoxetina em animais expostos a dieta materna perinatal hiperlipídica e hipercalórica.

REFERÊNCIAS

- ABOU MRAD, J. et al. Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats. **Am J Physiol**, v. 262, n. 4. p. R684-8, 1992.
- AGRAWAL, A. A. Ecology: Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. **Science**, v. 294, n. 5541, p. 321–326, 2001.
- ANDERSON, E. J. et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 573–581, 2009.
- ANDERSON, G. M. Peripheral and central neurochemical effects of the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in humans and nonhuman primates: Assessing bioeffect and mechanisms of action. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 22, n. 5–6, p. 397–404, 2004.
- ANDRADE, S. E. et al. Use of antidepressant medications during pregnancy: a multisite study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, n. 2, 2008.
- ARIAS-CALDERÓN, M. et al. Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v. 6, n. 1, p. 15, 2016.
- BAACK, M. L. et al. Consequences of a Maternal High-Fat Diet and Late Gestation Diabetes on the Developing Rat Lung. p. 1–21, 2016.
- BARKER, D. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int J Epidemiol**, v. 31, p. 1235–1239, 2002a.
- BARKER, D. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 588–595, 2004.
- BARKER, D. J. P. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, 1989.
- BARKER, D. J. P. et al. Fetal origins of adult disease : strength of. p. 1235–1239, 2002b.
- BARROS, K. M. F. T. et al. Differential adaptations during growth spurt and in young adult rat muscles. **Animal**, v. 3, n. 1, p. 72–78, 2009.
- BAYOL, S. A.; FARRINGTON, S. J.; STICKLAND, N. C. A maternal “junk food” diet in

pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for “junk food” and a greater propensity for obesity in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 843–851, 2007.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; STICKLAND, N. C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **Journal of Physiology**, v. 567, n. 3, p. 951–961, 2005.

BAYOL, S.; JONES, D.; GOLDSPINK, G. Influence of maternal nutrition on post-natal skeletal muscle growth. v. 46, p. 2003, 2003.

BENNETT, B. M. R.; PETTIGREW, A. D. A. G. THE FORMATION OF SYNAPSES IN STRIATED MUSCLE DURING DEVELOPMENT By. **J. Physiol**, v. 241, p. 515–545, 1974.

BERLE, J. Ø.; SPIGSET, O. Antidepressant Use During Breastfeeding. **Current women's health reviews**, v. 7, n. 1, p. 28–34, 2011.

BISHOP, D. J.; GRANATA, C.; EYNON, N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 4, p. 1266–1275, 2014.

BLUNDELL, J. E. Serotonin Manipulations and the Structure of Feeding Behaviour. **Appetite**, v. 7, p. 39–56, 1986.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. v. 254, p. 248–254, 1976.

BRAND-SABERI, B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. **Annals of Anatomy**, v. 187, n. 3, p. 199–207, 2005.

BRANDSTETTER, A. M., PICARD, B., GEAY, Y. Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle - II. Effect of castration and feeding level. **Livest Prod Sci**, v. 53, p. 15–23, 1998.

BRAZ, G. R. F. et al. Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 362–369, 2016.

BROOKE, M. H. K. K. K. Muscle fiber types: How many and what kind? 1970.

BUCKLEY, A. J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, n. 4, p. 500–507, 2005.

BUHL, E. S. et al. Treatment with an SSRI antidepressant restores hippocampo-hypothalamic corticosteroid feedback and reverses insulin resistance in low-birth-weight rats. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 298, n. 5, p. E920-9, 2010.

BUTLER-BROWNE, G. S.; WHALEN, R. G. Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. **Developmental biology**, v. 102, p. 324–334, 1984.

BUZNIKOV, G. A.; LAMBERT, W. H.; LAUDER, J. M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 305, n. 2, p. 177–186, 2001.

CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 8305, n. August, p. 1–12, 2017.

CAIAFFO, V. et al. Histomorphometric Evaluation of Soleus and Lateral. **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 3, p. 751–755, 2014.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review : early life nutrition and prenatal programming for adult disease. p. 3716–3729, 2015.

CASPER, R. C. et al. Length of prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants: Effects on neonatal adaptation and psychomotor development. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 2, p. 211–219, 2011.

CASTRO, R. M. DE. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. v. 34, p. 121–124, 2001.

CELI, P.; DI TRANA, A.; CLAPS, S. Effects of perinatal nutrition on lactational performance, metabolic and hormonal profiles of dairy goats and respective kids. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 2–3, p. 129–136, 2008.

CHANG, C.-C. et al. Effects of antidepressant treatment on total antioxidant capacity

and free radical levels in patients with major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 2, p. 575–580, 2015.

CHEN, X. et al. Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–13, 2012.

CIAPAITE, J. et al. Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary fat overload differentially impact fast- versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 155–164, 2015.

CONCEA, C. N. D. C. D. E. A. / M. D. C. T. E. I. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. **Vasa**, p. 1–50, 2013.

COTTRELL, E. C.; OZANNE, S. E. Early life programming of obesity and metabolic disease. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 17–28, 2008.

CRANE, J. D. et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. **Nature Medicine**, v. 21, n. 2, p. 166–172, 2015.

CRISTINA, T. et al. A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. p. 1071–1074, 2011.

CRUNKHORN, S. et al. Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 expression is reduced in obesity: Potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15439–15450, 2007.

CUNHA, S.; MOLLE, R. D.; PORTELLA, A. K. Both Food Restriction and High-Fat Diet during Gestation Induce Low Birth Weight and Altered Physical Activity in Adult Rat Offspring: The “ Similarities in the Inequalities ” Model. v. 10, n. 1, p. 1–18, 2015.

DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 92, n. 4, p. 330–337, 2014.

DA SILVA, A. I. et al. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**,

v. 40, n. 6, p. 565–574, 2015.

DA SILVA ARAGÃO, R. et al. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 1, p. 70–83, 2014.

DE WILDE, J. et al. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 3, p. 360–369, 2007.

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1503–1509, 2004.

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 2, p. 338–344, 2006.

DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 80, n. 1, p. 261–270, 1996.

DIEMERT, A. et al. Maternal nutrition, inadequate gestational weight gain and birth weight: Results from a prospective birth cohort. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

DOMINGUEZ-SALAS, P. et al. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–7, 2014.

DONOVAN, M. H.; TECOTT, L. H.; HORVATH, T. L. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2013.

DOOSTI, M. H. et al. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 43, p. 55–65, 2013.

DRAEGER, A. WEEDS, A. G. AND FITZSIMONS, R. B. Primary, Secondary and Tertiary Myotubes in Developing Skeletal Muscle: A New Approach to the Analysis of Human Myogenesis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 81, p. 19–43, 1987.

DU, M. et al. Maternal Obesity, Inflammation, and Fetal Skeletal Muscle Development¹. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 4–12, 2010.

ENOS, R. T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 1, p. 152–163, 2013.

FANG, H. et al. Exercise intolerance and developmental delay associated with a novel mitochondrial ND5 mutation. **Scientific Reports**, v. 5, n. October 2014, p. 1–11, 2015.

FERREIRA, D. S. et al. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutritional Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 369–375, 2016.

FERRO CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157–1168, 2013.

FLINT, D. J. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1179–E1187, 2005.

FLYNN, H. A.; BLOW, F. C.; MARCUS, S. M. Rates and predictors of depression treatment among pregnant women in hospital-affiliated obstetrics practices. **General Hospital Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 289–295, 2006.

FRIESEN, R. Maternal dietary fat alters amniotic fluid and fetal intestinal membrane essential n-6 and n-3 fatty acids in the rat. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 3, p. G505–G510, 2006.

FRONTERA, W. R., OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 2015.

GALINDO, L. C. M. et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 76–81, 2015.

GALLOWAY, T. F. ET AL. Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 13, p. 2432–2441, 2006.

GARBER, A. J. Inhibition of serotonin of amino acid release and protein degradation in skeletal muscle. **Molecular Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 640–651, 1977.

GARFIELD, A. S.; HEISLER, L. K. Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 1, p. 49–60, 2009.

GEOGHEGAN, J. G. et al. The effect of caloric load and nutrient composition on induction of small intestinal satiety in dogs. **Physiology and Behavior**, v. 62, n. 1, p. 39–42, 1997.

GLAZOVA, N. Y. et al. Effects of neonatal fluvoxamine administration on the physical development and activity of the serotonergic system in white rats. **Acta Naturae**, v. 6, n. 22, p. 98–105, 2014.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; PINAL, C. Developmental origins of adult disease. **Maternal and Child Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 130–141, 2005.

GOSKER HR VAN MAMEREN H, VAN DIJK PJ, VAN DER VUSSE GJ, WOUTERS EF, SCHOLS AM, E. M. P. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary . **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 113–119, 2002.

GREISING, S. M. ET AL. Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 4, n. 5, p. 1–26, 2013.

GRZESKOWIAK, L. E.; GILBERT, A. L.; MORRISON, J. L. Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: Evidence from animal and human studies. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 101–109, 2012.

GUILLET-DENIAU, I.; BURNOL, A.-F.; GIRARD, J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 23, p. 14825–14829, 1997.

GUILLET-DENIAU, I.; GIRARD, J. Identification and Localization of a Skeletal Muscle Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Coupled to the Jak / STAT Pathway * Receptor Subtypes : Basic and Clinical Aspects (Per-. v. 272, n. 23, p. 14825–14829, 1997.

HALFORD, J. C. G. et al. Serotonergic drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Drugs**, v. 67, n. 1, p. 27–55, 2007.

HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D. E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 817–823, 2001.

HELLGREN, L. I. et al. Acute and perinatal programming effects of a fat-rich diet on rat muscle mitochondrial function and hepatic lipid accumulation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 93, n. 11, p. 1170–1180, 2014.

HESKETH, S. et al. Differential actions of acute and chronic citalopram on the rodent hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute restraint stress. **Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 3, p. 373–382, 2005.

HOEKS, J. et al. Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: Effect of high-fat feeding. **FEBS Letters**, v. 582, n. 4, p. 510–516, 2008.

IOSSA, S. et al. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. **Int J Obes (Lond)**, v. 26, n. 1, p. 65–72, 2002.

IRENA, N. ET AL. NEURODEVELOPMENT OF CHILDREN EXPOSED IN UTERO TO ANTIDEPRESSANT DRUGS. **The new england Journal of medicine.**, p. 5–9, 2013.

IZUMIYA, Y. et al. Fast/Glycolytic Muscle Fiber Growth Reduces Fat Mass and Improves Metabolic Parameters in Obese Mice. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 159–172, 2008.

KABARAN, S.; BESLER, T. T. Do fatty acids affect fetal programming? **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2015.

KARBASCHI, R. et al. Maternal high-fat diet intensifies the metabolic response to stress in male rat offspring. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 20, 2017.

KAWAUCHI, T. Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease. **Development Growth and Differentiation**, v. 56, n. 5, p. 335–348, 2014.

KELLEY, D. E. ET AL. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944–2950, 2002.

KELLY, S. A.; PANHUIS, T. M.; STOEHR, A. M. Phenotypic plasticity: Molecular mechanisms and adaptive significance. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1417–1439, 2012.

KINAST, K. et al. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. June, p. 1–17, 2013.

KNIGHT, C. H.; SORENSEN, A. Windows in early mammary development: Critical or not? **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 337–345, 2001.

KOZIMOR, A.; CHANG, H.; COOPER, J. A. Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety. **Appetite**, v. 69, p. 39–45, 2013.

KRENTZ, A. J.; FUJIOKA, K.; HOMPESCH, M. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 18, n. 6, p. 558–570, jun. 2016.

KRISHNAN, VAISHNAV AND NESTLER, E. the Molecular Neurobiology of. v. 455, n. 7215, p. 383–413, 1986.

KUMMET, G. J. et al. Neonatal SSRI exposure programs a hypermetabolic state in adult mice. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

LACERDA, D. C. et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 173, 2017.

LAKER, R. C. et al. Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2013.

LANGLEY-EVANS, S. C. et al. Manipulation of the maternal diet in rat pregnancy: Different approaches to the demonstration of the programming principle. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 573, p. 87–102, 2006.

LARSEN, S. et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 14, p. 3349–3360, 2012.

LATOUCHE, C. et al. Maternal Overnutrition Programs Changes in the Expression of Skeletal Muscle Genes That Are Associated with Insulin Resistance and Defects of Oxidative Phosphorylation in Adult. p. 237–244, 2014.

LEE, J. Y.; ZHAO, L.; HWANG, D. H. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. **Nutrition**

Reviews, v. 68, n. 1, p. 38–61, 2010.

LEECH, K. A.; KINNAIRD, C. R.; HORNBY, T. G. Effects of serotonergic medications on locomotor performance in humans with incomplete spinal cord injury. **Journal of neurotrauma**, v. 31, n. 15, p. 1334–42, 2014.

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 9, p. 851–864, 1998.

LEONARD, H. L. et al. Pharmacology of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Children and Adolescents. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 36, n. 6, p. 725–736, 1997.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 175–191, 2012.

LEWIS, D. et al. A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition. **Experimental Physiology**, v. 79, n. 3, p. 377–386, 1994.

LI, X. et al. Alternate-day high-fat diet induces an increase in mitochondrial enzyme activities and protein content in rat skeletal muscle. **Nutrients**, v. 8, n. 4, 2016.

LIU, J. et al. Intrauterine growth retardation increases the susceptibility of pigs to high-fat diet-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–13, 2012.

LIU, T. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 384–387, 2005.

LOWEY, S. ET AL. Substructure of the myosin molecule: I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **Journal of Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 1–29, 1969.

MALTIN, C. A. et al. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 359–374, 2001.

MANDRIOLI, R.; FORTI, G. C.; RAGGI, M. A. Fluoxetine metabolism and

pharmacological interactions: the role of cytochrome p450. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 2, p. 127–133, 2006.

MANHAES DE CASTRO, R. et al. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 121–124, 2001.

MATSAKAS, A.; PATEL, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to MATSAKAS, A.; PATEL, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to. **Histology & Histopathology**, p. 611–629, 2009. **Histology & Histopathology**, p. 611–629, 2009.

Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, n. 14, p. 2627–2633, 1972.

MIESE-LOOY, G.; ROLLINGS-SCATTERGOOD, J.; YEUNG, A. Long-term health consequences of poor nutrition during pregnancy. **Studies by Undergraduate Researchers at Guelph**, v. 1, n. 2, p. 73–81, 2008.

MIURA, S. et al. Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to β -adrenergic receptor activation and exercise. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4527–4533, 2008.

MOOTHA, V. K. ET AL. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 267–273, 2003.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012.

MUSUMECI, G. et al. Serotonin (5HT) expression in rat pups treated with high-tryptophan diet during fetal and early postnatal development. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 2, p. 335–343, 2014.

NAISMITH, D. J.; MORGAN, B. L. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. **Br. J. Nutr.**, v. 36, p. 563, 1976.

NAMKUNG, J.; KIM, H.; PARK, S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. **Molecules and cells**, v. 38, n. 12, p. 1023–1028, 2015.

NASCIMENTO, L. et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 8, p. 880–887, 2014.

NAYA, F. AND OLSON, E. MEF2: A transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 6, p. 683–688, 1999.

NELSON, S. M.; NELSON, S. M.; FLEMING, R. Obesity and reproduction : Impact and interventions Obesity and reproduction : impact and interventions. n. September 2007, p. 384–389, 2014.

NEUNHÄUSERER, D. et al. Human skeletal muscle: Transition between fast and slow fibre types. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 461, n. 5, p. 537–543, 2011.

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

NOVÍO, S. et al. Effects of Fluoxetine on the Oxidative Status of Peripheral Blood Leucocytes of Restraint-Stressed Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 109, n. 5, p. 365–371, 2011.

OLIVEIRA, T. W. S. et al. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. **Lipids**, v. 46, n. 11, p. 1071–1074, 2011.

OROZCO-SOLÍS, R. et al. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

OROZCO-SÓLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 481–492, 2009.

P.D. GOLLNICK, D. PARSONS, AND C. R. O.; D. Histochemistry Differentiation of Fiber Types in Skeletal Muscle from the Sequential Inactivation. p. 543–544, 1983.

PARLEE, S. D.; MACDOUGALD, O. A. **Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, mar. 2014.

PEIRIS, H. N. et al. Placental expression of myostatin and follistatin-like-3 protein in a model of developmental programming. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 4, p. E854–E861, 2010.

PETTE, D. Metabolic Differentiation of Distinct Muscle Types at the Level of Enzymatic Organization. **Muscle Metabolism During Exercise**, p. 33–49, 1971.

PETTE, D. **Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers**. [s.l: s.n.]. v. 116

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and cell biology**, v. 115, n. 5, p. 359–372, 2001.

PHILIPPI, M.; SILLAU, A. H. Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 189, p. 1–11, 1994.

PILEGGI, C. A. et al. Maternal high fat diet alters skeletal muscle mitochondrial catalytic activity in adult male rat offspring. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–11, 2016.

PINHEIRO, I. L. et al. Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake. **Behavioural Brain Research**, 2017.

PLAGEMANN, A. et al. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 641–653, 2012.

POGLIANI, L. et al. Pharmacokinetics and Pharmacogenetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors During Pregnancy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 39, n. 2, p. 197–201, 2017.

QU, Y. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 469–473, 2009.

RAIPURIA, M.; BAHARI, H.; MORRIS, M. J. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015.

- RASBACH, K. et al. {5-Hydroxytryptamine} Receptor Stimulation of Mitochondrial Biogenesis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 2, p. 632–639, 2010.
- REEVES, J. et al. An Improved Procedure for the Preparation of Crystalline Lactic Dehydrogenase from Hog Heart *. v. 238, n. 12, 1963.
- REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–432, 2007.
- RITOV, V. B. et al. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 8–14, 2005.
- RIVERA, H. M.; CHRISTIANSEN, K. J.; SULLIVAN, E. L. The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. June, p. 1–16, 2015.
- ROZENBLIT-SUSAN, S.; CHAPNIK, N.; FROY, O. Metabolic effect of fluvoxamine in mouse peripheral tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 424, p. 12–22, 2016.
- RUIZ-ROSADO, A. et al. Histochemical and morphometric analysis of muscle fiber type transformation during the postnatal development of the chronically food-deprived rat. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 372–381, 2013.
- SÁNCHEZ, S. et al. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 317, n. 1–2, p. 105–111, 2008.
- SCHIAFFINO, S. ET AL. Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. **Acta Physiol Scand**, v. 134, n. 4, p. 575–576, 1988.
- SCHWERZMANN, K. et al. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 5, p. 1583–1587, 1989.
- SHAW, M. A.; RASMUSSEN, K. M.; MYERS, T. R. Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats. **J Nutr**, v. 127, n. 1, p. 64–69, 1997.
- SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. **Biochem J**, v. 114, n. 3, p. 597–610, 1969.

SHORTREED, K. E., KRAUSE, M. P., HUANG, J. H., DHANANI, D., MORADI, J., CEDDIA, R. B., & HAWKE, T. J. Muscle-Specific Adaptations, Impaired Oxidative Capacity and Maintenance of Contractile Function Characterize Diet-Induced Obese Mouse Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

SILVA CORNACHIONE, A. et al. Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats. **Acta Histochemica Et Cytochemica**, v. 44, n. 2, p. 43–50, 2011.

SUMMERBEL, D. AND RIGBY, P. W. Transcriptional Regulation during Som i togenesis. **Curr Top Dev Biol**, v. 48, p. 301–18, 2000.

SUNMIN, P.; SOO, B. C. Does fluoxetine administration influence insulin resistance in 90% pancreatectomized rats? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 1, p. 38–43, 2002.

TAKASU, T.; HUGHES, B. P. Lactate dehydrogenase isozyme patterns in human skeletal muscle. I. Variation of isozyme pattern in the adult. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 175–9, 1969.

TANNER, C. J. et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 282, n. 6, p. E1191–E1196, 2002.

TEPP, K. et al. Bioenergetics of the aging heart and skeletal muscles: Modern concepts and controversies. **Ageing Research Reviews**, v. 28, p. 1–14, 2016.

TOMÁS SOUKUP, GISELA ZACHAROVÁ, AND V. S. Fiber type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred lewis rats. v. 104, n. 4, p. 399–405, 2002.

TOSCANO, A. E. et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sciences**, v. 82, n. 21–22, p. 1131–1136, 2008.

TOSCANO, A. E. et al. Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. **Clinics**, v. 65, n. 12, p. 1363–1369, 2010.

TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270–278, 2008.

- TSUJINO, S.; NONAKA, I. Glycogen Storage. v. 18, n. 1, p. 125–150, 2000.
- TURNER, N. et al. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: Evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085–2092, 2007.
- UNGER, R. H. et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 209–214, 2010.
- VICKERS, M. H. et al. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1906–1913, 2008.
- WALTHER, D. J. ET AL. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. **Neuroscience**, v. 76, n. January, p. 7, 2003.
- WANG, Y.; PESSIN, J. E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 3, p. 243–250, 2013.
- WATANABE, H. et al. Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014.
- WATANABE, H. et al. Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.
- WATERLAND, R. A; JIRTLE, R. L. Transposable Elements : Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation Transposable Elements : Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. **Society**, v. 23, n. 15, p. 5293–5300, 2003.
- WATT, D. J. ET AL. The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse. **Anatomy and Embryology**, v. 175, n. 4, p. 527–536, 1987.
- WHITE, R. B. et al. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.
- WILSON, B. Y. P. N.; OSBOURN, D. F. Compensatory Growth After Undernutrition. n. September, 1959.

WU, G. et al. Maternal Nutrition and Fetal Development. **The Journal of Nutrition**, n. 13, p. 2169–2172, 2004.

WURTMAN, R. J.; WURTMAN, J. J. Brain Serotonin, Carbohydrate-Craving, Obesity and Depression. **Obesity Research**, v. 3, n. S4, p. 477S–480S, 1995.

YU, F. et al. Gender- and age-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the contractility and myosin composition of single rat soleus muscle fibres. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 437, n. 1, p. 21–30, 1998.

ZAMMIT; NEWSHOLME, E. A. The Maimum Activities of Hexo inase , Phosphorylase , Phosphofructokinase , Carbohydrate Utilization in Muscles from Marine Invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 160, n. 3, p. 447–462, 1976.

ZHU, M. J. et al. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **Journal of Physiology**, v. 575, n. 1, p. 241–250, 2006.

ZIMMERMANN, N. et al. Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels. **Biochemical Journal**, v. 448, n. 1, p. 93–102, 2012.

Apêndice 1 - ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

SELECTIVE SEROTONIN REUPTAKE INHIBITORS AFFECTS MORPHOLOGY AND METABOLISM OF SKELETAL MUSCLE IN RODENTS: A SYSTEMATIC REVIEW

Diego Bulcão Visco¹, Raul Manhães-de-Castro², Wenicios Ferreira Chaves³, Glayciele Leandro Albuquerque⁴, Diego Cabral Lacerda⁵, Aline Isabel da Silva⁶, Kelly Nogueira Ferraz-Pereira⁷, Ana Elisa Toscano⁸

¹Postgraduate Program in Physical Therapy, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil. ²Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. ³Graduation in Nutrition, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil. ⁴Graduation in Physical Therapy, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil. ⁵Postgraduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil. ⁶Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry; CAV-Federal University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antão, Brazil. ⁷Department of Physical Education and Sports Science, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil. ⁸Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

*Corresponding author at: Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo. Antão, PE, Brazil. Phone number: +55 81 31144100 aeltoscano@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of this systematic review was to explore and discuss the effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) on skeletal muscle properties of rodents during pre and/or post-natal life. A systematic search of PUBMED, SCOPUS and WEB OF SCIENCE was performed. The inclusion criteria were studies in rodents that analyzed effects of SSRI in skeletal muscle. After selection of the relevant articles, 134 papers with rodent models were included to assess eligibility. The SYRCLE Risk of bias (RoB) tool was used to assess the quality of evidence. Five articles were included in final analyses. The ROB tool indicates heterogeneities between the included articles. The intervention with fluoxetine, escitalopram, fluvoxamine was used in different doses and via of administration in studies. Male Wistar rats, Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice were used as a sample at different ages. Included articles report that SSRI increased levels of phosphorylated Acetyl CoA Carboxylase (pACC) on C2C12 myotubes in mice. An increased Citrate Synthase (CS) activity and mitochondrial respiration and decreased Reactive Oxygen Species (ROS) in muscle were reported after SSRI. Reduction of muscle weight and decrease number of myonuclei and cross section area of muscle fiber were also observed. Rates of insulin-stimulated glucose uptake in muscle were recovered by escitalopram exposure. Besides, an increase in Protein Kinase B (PKB) Ser phosphorylation improvement in insulin signaling in skeletal muscle was observed. Glycogen deposits and glucose uptake were higher and triglyceride content was lower after SSRI exposure. SSRI acts on skeletal muscle causing morphological and metabolic changes in animals.

KEYWORDS: Serotonin uptake inhibitors; Serotonin; Skeletal Muscle; Rodents; Systematic review

1 INTRODUCTION

Antidepressant drug use has increased during last decades [1]. Among antidepressants, Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) is widely prescribed for a range of behavioral and psychiatric problems, such as to treat depressive disorders in women during perinatal and postpartum [2]. This class of medication act to modulate the serotonergic system, inhibiting the serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) uptake centrally and peripherally [3].

SSRI selectively inhibits membrane associated Serotonin-Transporter (SERT) thus inhibits the 5-hydroxytryptamine (5-HT) re-uptake. SSRI are believed to exert antidepressant effects by blocking SERT uptake of serotonin from extracellular space, thereby enhancing 5-HT signaling [4]. The relationship between the therapeutics and adverse effects of SSRIs remain to be more explored.

Serotonin plays a dual role in development, the autoregulation of serotonin neurons themselves, and secondly, the development of target tissues [5]. Although modifying the serotonin system might be involved in the development of some disorders [6, 7, 8]. Some studies have demonstrated that the manipulation with SSRI cause damage on development of animals, including growth retardation in intrauterine and premature birth, reduced body weight, delay of growth, impaired bone homeostasis and altered feed behavior [9, 10, 11].

The pharmacological manipulation of SSRIs during a critical period of development can modify the important regulatory functions of the serotonergic system and consequently induced changes in neurogenesis and neural growth, further embryogenesis and morphogenesis [5, 12]. Ortuno et al. [11] reports the inhibition of the SERT impaired bone formation. After manipulation with SSRI, there was decreased the index of central and peripheral transporter blockade [13]. Increased synaptic availability of serotonin stimulates a large number of postsynaptic receptor subtypes that lead to complex these secondary responses [12, 14].

Although centrally serotonin leads to reduce food intake and satiety [15], facilitate or inhibit the action of this system can inducing changes on morphology and properties of skeletal muscle [12]. Some studies indicate the effect of 5-HT on muscle metabolism via specific receptor. The functional serotonin 5-HT_{2A} receptor is expressed

in rat myoblast and resides at the plasma membrane activating the intracellular phosphorylation and t-tubules in contracting myotubes [16]. The expression of genes involved in myogenic differentiation and glucose utilization is regulated for the 5-HT-mediated signaling via this receptor. 5-HT can rapidly stimulate glucose uptake in skeletal muscle [16, 17].

Serotonin action most probably involves primary inhibition of protein degradation, which thereby results in a decreased availability of precursor amino acid substrates for conversion to alanine and glutamine, indicating that serotonin has direct effects on skeletal muscle metabolism, independent of the vasoactive properties [18]. In this context, the following focused question of this systematic review is "What are the effects of SSRIs on metabolic and morphological properties of skeletal muscle of rodents during the gestation period and post-natal life? "

2. RESULTS

A total of 2536 articles were identified through electronic database searching, and 5 found in reference list of other articles. 1704 duplicates were removed. 832 records were screened for title and abstract, 134 full texts were assessed for eligibility, that 129 were excluded because the exclusion criteria (not an original primary study, no rodents study, no treatment with SSRI and that outcome interest were not reported). Five articles were included in the final analysis, all of the studies were published in English. The inclusion criteria were looked for intervention with SSRI versus placebo for skeletal muscle properties changes in rodents models during prenatal or post natal life. The search steps are shown in Figure 1.

The risk of bias was carried out using the SYRCLE RoB tool for two independent researchers. The result of Kappa test results in a substantial agreement $\text{Kappa}=0,697$, 95% CI (0.28-1,0) for items of the tool. Most of included articles didn't report adequate sequence generation and allocation concealment, there was only one that performed a random sequence generation and however the baseline characteristics of included animals were very similar. One article select the sample by random to assess the outcome. One article reported exclusion of animals because of assessment

parameters. All studies not reported the housing random, either blinding of researcher and caregivers. Figure 2 summarizes the Risk of Bias analysis.

All studies included had the animal ethics committee approval. The characteristic of included articles and the outcomes of relevance to the review question are presented in table 1. Most studies used male pups rats to assess the outcomes of interest, only one study used C57BL/6 male mice. Just one study did an intervention in a pregnant rat.

Rozenblitz-Susan, Chapnik, Froy, 2016 [19] studied the intervention of fluvoxamine on the cell differentiation to myotubes, metabolic gene and protein expression in mouse muscle. At 60 days old was realized enzymatic calorimetric tests, extraction of RNA from muscle, lipid content quantification, quantitative real time of PCR and Western blot analysis. Compared to a control, there were an increased level of phosphorylated Acetyl CoA Carboxylase (pACC) on C2C12 myotubes in mice after fluvoxamine (9 mg/Kg/day) administration dissolved in water, which could indicate reduced fatty acid synthesis as a result of increased β -oxidation [19]. These results show that there was no overall change in lipid content in muscle cells, probably due to the high pACC on the one hand and low phosphorylated protein phosphatase 2A (pPP2A) on the other hand [19].

Silva et al. (2015) [20] studied the effects of chronic treatment with fluoxetine (10 mg/kg) injected subcutaneously in male Wistar pups during suckling period, on the mitochondrial bioenergetics of the skeletal muscle of young rats. The enzymatic activity, mitochondrial protein concentration, mitochondrial oxygen consumption mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) production, mitochondrial pore opening, oxidative stress evaluation were determined of muscles samples. The results indicate that increasing serotonin at synaptic terminals early in life in male rats, resulted in an increased citrate synthase (CS) activity, increased mitochondrial respiration and decreased ROS production in Extensor Longus Digitorum (EDL) muscle at 60-day old male rat after fluoxetine treatment. Mitochondria from fluoxetine group had higher respiration rates than the corresponding control group and in this group less ROS than the control group. The EDL muscle in the fluoxetine group is more resistant to calcium-induced mitochondrial pore opening than control. However, the oxidative stress levels did not change, associating with the decreased levels of ROS.

In the study of Caiafo et al., (2014) [21] the authors evaluate the treatment of subcutaneous injection of fluoxetine (10 mg/kg) on muscle weight, number of nuclei

myocyte cells and cross-sectional area of muscle fibers of Wistar rats at 30 and 90 days old. Caiafo et al. (2014) observed a reduction of myonuclei number in soleus and lateral gastrocnemius assessed at 30 and 90 days old. Muscle cross sectional area was also reduced in animals treated with fluoxetine both early and later phase of development. The reduction of soleus and gastrocnemius muscle weight was observed in animals treated with fluoxetine only at 90-day.

Buhl et al. (2010) [22] studied the effects of escitalopram (1,4 mg/ml) injected intraperitoneally to restore the insulin sensitivity in low birth weight rats. These authors evaluated estimative rates of insulin-stimulated glucose transport activity in muscle tissue and also glycogen levels, Protein Kinase B (PKB) Ser phosphorylation expression and total crude membrane GLUT4 contents in skeletal muscle at 40 days old [22]. The results showed that SSRI could change metabolic process and signaling of insulin [22]. The insulin caused an increase in red gastrocnemius (RG) PKB Ser phosphorylation, suggesting that insulin resistance can be reversed by treatment with escitalopram. Rates of insulin-stimulated glucose uptake in RG were normalized with escitalopram treatment in low birth weight rats, but this not observed in white gastrocnemius muscle tissue. Glycogen content and GLUT4 protein were similar in all groups of the study, with RG muscle tissue showing the lowest glycogen content and the highest GLUT4 protein concentration compared to white gastrocnemius. These results suggest that escitalopram administration leads to a tissue-specific improvement in insulin signaling in RG muscle of low birth weight Sprague-Dawley rats.

Insulin and glucose uptake was evaluated after oral fluoxetine (5 mg/kg) treatment in the study of Sunmin & Soo (2002) [23]. Muscle tissue was used to determine glucose uptake and glycogen and triglyceride contents. This study showed that glycogen deposits in the soleus muscle were affected by fluoxetine administration and diabetes status after pancreatectomized (Px) rat or sham surgery at 120 days old of male Sprague-Dawley rats. Fluoxetine treatment increased glycogen deposits more than placebo of the soleus muscle of sham and Px rat. Triglyceride content decreased with fluoxetine administration in sham and px rats compared to placebo. Glucose uptake was higher with fluoxetine administration than placebo in sham and px rats.

3. DISCUSSION

Based on these findings this review showed that skeletal muscle is a plastic tissue that is responsive to influences of SSRI's. Skeletal muscle plays an important role in many metabolic processes [24, 25], however, the mechanism that changes the properties of this tissue through pharmacological influence remains unclear. The environmental influences during critical period of development and skeletal muscle capacity to respond these challenges have been increased attention during the last decades [26]. Given this, this systematic review aimed to summarize the pre clinical evidence on the alteration of skeletal muscle properties due to the influence of SSRI.

Serotonin is a neurotransmitter that has a functional diversity, it's involved in cell growth control, neural development, and muscle metabolism [25, 26, 27, 28]. Inhibiting the reuptake of serotonin in the central nervous system can also affect the peripheral tissues [14, 29]. SSRI is the most prescribed medication during gestation and lactation that affects serotonin neurotransmission, blocking SERT function [4]. These pharmacological influences demonstrate metabolic and structural changes on skeletal muscle [19, 20, 21, 22, 23]. Interaction with a variety of systems is possible through specific receptors [16].

The serotonin may be involved in the control of glucose uptake mediated via 5HT_{2A} receptor, making a reduction in circulating levels of blood glucose [16]. The activation of this receptor enhances the expression of genes associated with myogenic differentiation and stimulates skeletal muscle glucose transport [16]. The included articles reports changes in glucose uptake. The rates of insulin-stimulated glucose uptake were recovered by SSRI treatment in red gastrocnemius muscle with improvement in insulin signaling after 2-[1-¹⁴C]deoxyglucose injection [22] and glucose uptake was higher after the SSRI exposure compared to placebo group [23]. Even though it is important to considered the possible effects of SSRI on hypothalamic neurons and how this influence cause implications for whole body glucose homeostasis [30].

Authors showed in a rat myoblast the expression of 5-HT_{2A} receptor, a subtype of a receptor class that can trigger and activate different intracellular signaling system, like stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway [16]. Increased phosphorylation was observed after stimulation of 5-HT_{2A} receptor in skeletal muscle [16]. When plasma levels of 5-HT are elevated it is expected that 5-HT_{2A} receptor modulating the glucose transport, this condition is mediated by the use of glucose for

skeletal muscle [16]. In some metabolic conditions, as diabetes that serotonin levels were reduced, this issue must be considered for intervention strategy [31].

Fluoxetine as the most prescribe SSRI [32] and most used in included articles, was found to be a potent antagonist at muscular nicotinic acetylcholine receptors [33], inhibitors of neuronal Na^+ [34], voltage dependent potassium channels [35] and inhibitory effects on Ca^{2+} elicited constrictions on rat skeletal muscle arterioles [29]. This findings corroborates with Rozenblitz et al., (2014) [19] that showed an increased of pACC levels and reduced fatty acid synthesis as a result of increasing β -oxidation. Alteration in the mitochondrial function by influence in oxidative capacity results in an increase of CS [36]. SSRI results in an augmentation of mitochondrial oxidative phosphorylation reflected by high rates of Citrate synthase activity [20]. In this study, authors found a positive modulation of mitochondrial respiration in the skeletal muscle persisting into adulthood [20]. In the same context, treatment with escitalopram during critical period of development increased levels of PKB Ser phosphorylation in the muscle tissue indicating restore of insulin sensitivity in LBW rats [22]. Take together these results are in agreement with changes in insulin sensitivity, glucose metabolism and oxidative capacity after use of SSRI [36, 37, 38].

Morphological changes after exposure to SSRI reported by Caiafo et al., [21] are in agreement with others evidence that showed the impact of manipulation of these drugs in other peripheral tissues. Differences in heart morphology after fluoxetine neonatal treatment were observed [39]. There was observed that neonatal treatment with fluoxetine decreased heart weight, the cross-sectional area of the heart, cross-sectional area and perimeter of the cardiac cells [39]. Besides, SSRI may ameliorate cardiac hypertrophy and dysfunction [40]. However, deleterious effects on bone homeostasis were reported. Fluoxetine impaired osteoclast differentiation and function through a serotonin-reuptake-independent mechanism that is dependent on intracellular Ca^{2+} levels and transcription factor Nfatc1 [11].

Morphological muscle changes may be associated with weight loss [41] caused by these medications. The quantification of the cellular content may justify this occurrence. Although manipulation is not performed in early life, an included study [19] does not show global alterations in the lipid content in the cells of the muscles after fluvoxamine administration. However increased glycogen stores and decreased triglyceride content was showed after chronic exposure of fluoxetine in male rats during

adulthood [23]. From the functional point of view, it is important to maintain the glycogen stores as well as the level of cellular stress, as this can compromise the energy status in demanding metabolic conditions such as during physical exercise or disorders such as obesity and diabetes [42, 43].

In summary the evidence of included articles it seems to be consistent. Some articles included in this review report a beneficial effect of the use of this class of medication, but the possible adverse effects were not discussed in included articles. More studies need to be performed observing the skeletal muscle outcomes. Therefore, as the muscle is responsible for a series of metabolic process and energy balance, peripheral serotonin is a possible target for interventions in obesity, diabetes and other related metabolic disease.

3.1 *Quality of evidence and potential biases*

In the present study, we found heterogeneities between the included articles. Even the most of studies using rats as a sample model, different doses, drug administration form, period of manipulation, age at testing and especially the outcome assessed, make unfeasible the application of the meta-analysis.

The main limitation observed in the included studies is the fact that does not exist a data base with study protocol published, that allows verified the original aim of the studies and facilitate the risk of bias analysis. The results of the risk of bias tool not present an elevated level of evidence, this fact could be associated there was no establishment of random sequence in animals models used as a sample, and random housing [44]. The blinding of researcher and caregivers was not reported for any author, difficulting the process of bias analysis, even though the baseline characteristics were similar in all animals used.

The reduced number of included articles may be justified for the specificity of the search terms used as an intervention, whereas the pharmacokinetics properties of SSRI's were very restricted, making possible standardize the intervention. The animals models used were adequate to assess the outcomes of interest in each study and the possible adverse effects were not discussing and reported for any included article. No other language publication was found, but this was not an exclusion criteria for the search through the data bases.

However, we elucidate the importance of improving the internal validity of animal studies. Many entries in RoB tool was judge as “unclear” risk of bias, this fact revealed that reporting experimental details on animals, methods and materials is very poor [44]. These conditions illustrate the necessity of further investigation on the role of the peripheral serotonin as a target of manipulating the skeletal muscle tissue.

The evidence presented in this systematic review provide aspects of influence of manipulation with SSRI on skeletal muscle. This drug causes many metabolic and morphological changes like an increase glycogen deposits, in glucose uptake, in citrate synthase activity, mitochondrial respiration and also promoted a reduction in muscle weight and cross section area of muscle fiber after chronic exposure during development. However, the underlying mechanism remains unclear. Studies investigating the mechanism underlying the changes in skeletal muscle in some conditions like exercise or models of obesity and metabolic syndrome should be performed in order to clarify the role of serotonin in some metabolic conditions. Although these results were derived from animals studies the role of serotonin in humans remain unclear.

4. METHODS

Our review was carried out using a protocol published on CAMARADES available on <http://syrf.org.uk/protocols> and the author reports of systematic review were done based on the recommendation for PRISMA Statement [45].

4.1 Search Strategy

Relevant articles were identified by searching the PUBMED (1966-2017), SCOPUS (1950-2017) and WEB OF SCIENCE (1900- 2017) databases. Searches were performed by hand searching for two independent reviewers (VISCO and CHAVES). Discrepancies that can not be resolved by discussion will be resolved by an additional investigator (TOSCANO). The search was conducted between October/2016 and January/2017. The references list of the included articles was also assessed. Electronic databases were searched based on PICOS and the following MeSH terms were included in the search: P= rodents, I= serotonin reuptake inhibitors, C= placebo, O= skeletal muscle, S= animals models. The initial phase of screening was

based on title and abstract in relation to research question. The full-text screening was based on inclusion/exclusion criteria.

4.2 Inclusion Criteria

The inclusion criteria of the included studies are primary studies, preclinical and controlled that using rodents models with any sex and age at testing, exposure to SSRI during pregnancy or prenatal, perinatal or post natal exposure. Any method to assess the muscle skeletal properties was included. The search has not language and publication date restriction.

4.3 Exclusion criteria

Not controlled studies, reviews, humans studies or using other animals, treatment with non-SSRI, no access to the full text, were excluded. The articles that not report skeletal muscle outcomes were excluded.

4.4 Data extraction

The data were extracted through readings, titles, abstracts and full text, in accordance with the inclusion and exclusion criteria independently by two independent researchers. The characteristics extracted from each included articles was article name of first author, year, title, animal model characteristics (strain, sex, age at testing), number of groups, type of intervention, administration method, dosage and muscle outcomes.

4.5 Assessment of methodology quality

Bias assessment was done at studies using the SYRCLE Risk of Bias (RoB) tool adapted. This tool is specific to improve critical appraisal of evidence in animal studies [44]. Every study was assessed and the judgment of each item was: low, unclear or high risk. Random sequence generation, baseline characteristic, allocation concealment, random housing, blinding of participants and personnel, random outcome assessment, blinding of outcome assessment, incomplete outcome data, selective reporting, and other bias were the items judged. The Kappa statistics were performed to evaluate the inter-observer agreement for items of risk of bias tool [44] using

an online calculator. We synthesized the information in summary tables, figure and in a descriptive summary, enabling comparison of results. The Review Manager Software Package was used to create a figure that summarizes the quality of evidence.

AKNOWLEDGMENTS

The author's thanks, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for their financial support.

DISCLOSURE

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Andrade, S. E., Raebel, M. A., Brown, J., Lane, K., Livingston, J., Boudreau, D. Platt, R. Use of antidepressant medications during pregnancy: a multisite study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008; 198: 2. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.07.036>
2. Berle, J. Ø., & Spigset, O. Antidepressant Use During Breastfeeding. *Current Women's Health Reviews*. 2011; 7: 1: 28–34. <https://doi.org/10.2174/157340411794474784>.
3. Sangkuhl, K., Klein, T., & Altman, R. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2009; 19: 11; 907–909. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833132cb>.
4. Chen, X., Margolis, K. J., Gershon, M. D., Schwartz, G. J., & Sze, J. Y. Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. *PLoS ONE*. 2012; 7: 3: 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032511>.
5. Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P., & Lauder, J. M. Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research*. 1995; 73:1–2: 19–29. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00071-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00071-X).
6. Deiro, T. C. B. J. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 10: 1503-1509. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004001000009>.
7. Seo, D., Patrick C.J., Kennealy P.J. Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. *Aggression and violent behavior*. 2008; 13: 5: 383-395. doi:10.1016/j.avb.2008.06.003.
8. Magalhães, C. P. et al. Modulatory role of serotonin on feeding behavior. *Nutr Neurosci*. 2010; 12: 6: 246-55. DOI: 10.1179/147683010X12611460764723.
9. Aggarwal, A., Jethani, S. L., Rohatgi, R. K., & Kalra, J. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) induced weight changes: A dose and duration dependent study on albino rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016; 10: 3: AF01-AF03. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16482.7376>.
10. Walline, C. C., Nichols, D. E., Carroll, F. I., & Barker, E. L. Transporter Associated With Substrate and Antagonist Recognition. *Molecular Pharmacology*. 2009; 325: 3: 791–800. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.136200>.
11. Ortuno, M. J., Robinson, S. T., Subramanyam, P., Paone, R., Huang, Y., Edward Guo, X., ... Ducey, P. Serotoninreuptake inhibitors act centrally to cause bone loss in mice by counteracting a local antiresorptive effect. *Nature Medicine*. 2016; 9–11. <https://doi.org/10.1038/nm.4166>.
12. Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 2001; 305. 2: 177-86.
13. Tatsumi, M., K. Groshan, R. D. Blakely, and E. Richelson. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol*. 1997; 340: 249–258.
14. Anderson, G. M. Peripheral and central neurochemical effects of the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in humans and nonhuman primates: Assessing bioeffect and mechanisms of action. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2004; 22: 5–6: 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.06.006>.

15. Halford, J.C.G., Boyland, E.J., Blundell, J.E., Kirkham, T.C., Harrold, J.A. Pharmacological management of appetite expression in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6: 255–269. doi:10.1038/nrendo.2010.19.
16. Hajdúch, E., Rencurel, F., Balendran, A., Batty, I. H., Downes, C. P., & Hundal, H. S. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274: 19; 13563–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13563>.
17. Guillet-Deniau, I., Burnol, A.-F., & Girard, J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23: 14825–14829. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14825>.
18. Garber, J. Inhibition of serotonin of amino acid release and protein degradation in skeletal muscle. *Molecular Pharmacology.* 1977; 13: 4: 640–651. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/196173>.
19. Rozenblit-Susan, S., Chapnik, N., & Froy, O. Metabolic effect of fluvoxamine in mouse peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2016; 424: 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.009>.
20. da Silva AI, Braz GRF, Silva-Filho R, Pedroza AA, Ferreira DS, Manhães de Castro R, et al. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015; 40: 6:565–74. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2014-0462>.
21. Caiaffo, V., Ribeiro, A. S. C., Oliveira, B. D. R., Albuquerque, Y. M. L., & Moraes, S. R. A. de. Histomorphometric Evaluation of Soleus and Lateral Gastrocnemius Muscles of Animals Submitted to Pharmacological Manipulation with Fluoxetine. *International Journal of Morphology.* 2014; 32: 3: 751–755. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000300001>.
22. Buhl, E. S., Jensen, T. K., Jessen, N., Elfving, B., Buhl, C. S., Kristiansen, S. B., ... Petersen, K. F. Treatment with an SSRI antidepressant restores hippocampo-hypothalamic corticosteroid feedback and reverses insulin resistance in low-birth-weight rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism.* 2010 298: 5:E920-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00606.2009>
23. Sunmin, P., & Soo, B. C. Does fluoxetine administration influence insulin resistance in 90% pancreatectomized rats? *Metabolism: Clinical and Experimental.* 2002; 51; 1; 38–43. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.26712>.
24. Matsakas, A., Patel, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol.* 23. (2009). 611-629. doi: 10.14670/HH-24.611.
25. Namkung, J., Kim, H., & Park, S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. *Molecules and Cells,* 38. (12). (2015). 1023–1028. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0258>.
26. Watanabe, H. et al., Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep. *Plos one.* 9. (2). (2014). doi:10.1371/journal.pone.0088058.
27. Borue, X. Chen, J. Condron, B. Developmental effects of SSRI'S- Lessons learned from animal studies. *Int J Dev Neurosci.* 25. (6). (2007). 341-347. 2007. doi: [10.1016/j.ijdevneu.2007.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.06.003).
28. Garber a J. Inhibition of serotonin of amino acid release and protein degradation in skeletal muscle. *Mol Pharmacol [Internet].* 13, (4). (1977). 640–51.
29. Pachter P, Ungvari Z, Kecskemeti V, Koller A. Serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, dilates isolated skeletal muscle arterioles. Possible role of altered Ca²⁺ sensitivity. *Br J Pharmacol [Internet].* 127. (3). (1999)740–6. doi: [10.1038/sj.bjp.0702571](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702571)
30. Karnani M, Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2011; 300:1:R47-R55. doi:10.1152/ajpregu.00527.2010.
31. Martin, F. J., Miguez, J. M., Aldegunde, M., and Atienza, G. Effect Of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus On Serotonin Measures Of Peripheral tissues in rats. *Life Sci.* 1995; 56: 51–59. doi: [10.1016/0024-3205\(94\)00407](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00407).
32. M.I. Wilde and P. Benfield. Fluoxetine. A pharmacoeconomic review of its use in depression. *Pharmacoeconomics.* 1998; 13: 543-561. DOI: [10.2165/00019053-199813050-00007](https://doi.org/10.2165/00019053-199813050-00007).
33. Miledi R. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). 1997; 94; 2041–4. DOI: [10.1073/pnas.94.5.2041](https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.2041).
34. Pancrazio J. J., Kamatchi G.L., Roscoe A.M.Y.K., Iii C.L. Inhibition of Neuronal Na² Channels by Antidepressant Drugs. 1998; 284: 1: 208–14.
35. Tytgat J., Maertens C., Daenens P. Effect of fluoxetine on a neuronal , voltage-dependent potassium. 1997; 1417–24. doi: [10.1038/sj.bjp.0701545](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701545).
36. Lanza IR, Nair KS. Functional Assessment of Isolated Mitochondria In Vitro. *Methods in enzymology.* 2009; 457: 349-372. doi:10.1016/S0076-6879(09)05020-4.

- 37 Perdomo, G., Commerford, S. R., Richard, A. M. T., Adams, S. H., Corkey, B. E., O'Doherty, R. M., & Brown, N. F. Increased B-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 26: 27177–27186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403566200>
- 38 J.M., H., L., S., & S., F. Glucose metabolism and antidepressant medication. *Current Pharmaceutical Design*. 2012; 18: 36: 5900–5919. DOI : [10.2174/138161212803523662](https://doi.org/10.2174/138161212803523662)
39. Toscano, A.E. et al., Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sciences*. 2008; 82: 1131-1136. DOI: [10.1016/j.lfs.2008.03.013](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.03.013).
40. Hideaki Tagashira a, Md. Shenuarin Bhuiyan b, Norifumi Shioda a, Kohji Fukunaga. Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ 1-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life sciences*. 2014; 95: 89-100 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.019J>.
41. Wieczorek, I., Schulz, C., Jarry, H., & Lehnert, H. The effects of the selective serotonin reuptake-inhibitor fluvoxamine on body weight in Zucker rats are mediated by corticotropin-releasing hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25: 10: 1566–9. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801729>.
42. Parise G, Bosman MJ, Boecker DR, Barry MJ, Tarnopolsky M a. Selective serotonin reuptake inhibitors: Their effect on high-intensity exercise performance. *Arch Phys Med Rehabil [Internet]*. 2001; 82: 7:867–71.
43. El-merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*. 2015; 589. doi: [10.1016/j.febslet.2015.05.054](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.054)
44. Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., Vries, R. B. M. De, Leenaars, M., Ritskes-hoitinga, M., & Langendam, M. W. SYRCLE 's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology*. 2014; 14: 1:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
45. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & Grp, P. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement (Reprinted from *Annals of Internal Medicine*). *Physical Therapy*. 2009; 89: 9: 873–880. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.

Author (Year)	Strain	Age assessment	Groups	Intervention/ Dose	Muscle outcomes
Rozenblitz-Susan, Chapnik, Froy, 2016 [21].	C57BL/6 male mice	84 days	Experimental and control	Fluvoxamine (9mg/kg/day) dissolved in water. Placebo (water), for three weeks	Increase levels of phosphorylated Acetyl CoA Carboxylase on C2C12 myotubes. Reduced fatty acid synthesis as a result of increased b-oxidation. no overall change in lipid content in muscle cells.
Silva et al., 2015 [22].	Male wistar rat	60 days	Experimental and control during weaning period.	Subcutaneous injection of Fluoxetine (10 mg/kg) or Placebo: Saline (NaCl 0.9 %), during suckling period.	Increased citrate synthase activity, increased mitochondrial respiration and decreased Reactive Oxygen Species of extensor digitorum longus muscle.
Caiafo et al., 2014 [23].	Male Wistar rat	30 and 90 days	Experimental and control, during weaning period	Subcutaneous injection of Fluoxetine (10 mg/kg) or Placebo: Saline (NaCl 0.9%), during suckling period.	Reduction of the weight, number of myonuclei of muscle fiber and reduction of cross section area in soleus and lateral gastrocnemius.
Buhl et al., 2010 [24].	Pregnant and male Sprague-Dawley rats	40 days	Mother treated with dexamethasone or saline/litters 3 groups: Control, Low birth weight saline, LBW-ESC	Injected intraperitoneally twice a day with either Escitalopran 1,4 mg/ml. Placebo: Saline	Rates of insulin-stimulated glucose uptake in red gastrocnemius muscle were recovered by escitalopram exposure. Increase in Protein Kinase B Ser phosphorylation improvement in insulin signaling in muscle of low birth weight rats.
Sunmin & Soo, 2002 [25].	Male Sprague-Dawley rats	120 days	Pancreatectomized (Px) or sham surgery. Both of the Px and Sham rats were divided 2 groups: 1 group was given FXTN or placebo	Orally fluoxetine 5mg/Kg. Placebo: mint-flavored water During 8 week	Increased glycogen deposits, decreased the triglyceride content and glucose uptake was higher more than placebo in sham and pancreatectomized rats of the soleus muscle.

Table 1. Characteristics of include studies.

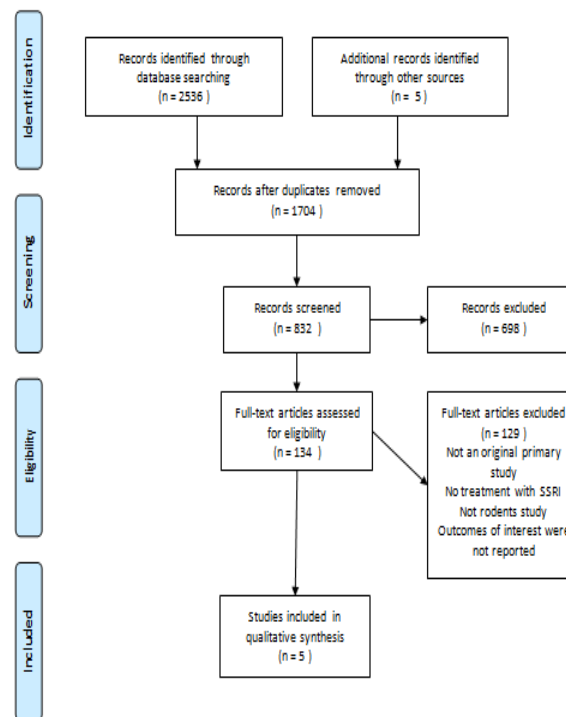


Figure. 1. Prisma flow diagram of systematic review search.

	Random sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Random Housing (performance bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Random outcome assessment (detection bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
BUHL et al. 2010.	⊖	⊕	⊖			⊖	⊕	⊖		
CAIAFO et al. 2014.	⊖	⊕	⊖			⊕	⊕	⊕		
ROZENBLIT-SUSAN, CHAPNIK, FROY 2016.	⊕	⊕	⊖			⊖	⊕	⊕		
SILVA et al. 2015.	⊖	⊕	⊖			⊖	⊕	⊕		
SUNMIN; SOO, 2002.	⊖	⊕	⊖			⊖	⊕	⊕		

Figure 2. Risk of bias summary: review authors judgments about each risk of bias item of SYRCLE RoB tool for each included study.

Apêndice 2 - ARTIGO ORIGINAL

Neonatal fluoxetine administration alters skeletal muscle phenotype in rats exposed to a high-fat maternal perinatal diet.

Visco, D. B. Manhaes-de-Castro, R., Braz, G. R. F, Silva, A. d. Lagranha, C. J. Toscano, A. E.

ABSTRACT

Objective: To assess short and long term-effects of neonatal fluoxetine administration on skeletal muscle fibers proportion and enzymatic activity in muscle of rats exposed to a High-fat/hypercaloric maternal perinatal diet.

Methods: Male Wistar rats were allocated according to their mother's diet and neonatal fluoxetine administration: Normocaloric/Normolipidic diet (NN 354,65 Kcal/100g) and High-fat/Hypercaloric diet (HH 483,93 Kcal/100g). At birth, pups received a Fluoxetine (F) administration (10 mg/kg) or saline (S) during lactation composing the following groups: (NS: NN+S; NF: NN+F; HS: HH+S; HF: HH+F). At killing, soleus and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscle were dissected to assess muscle weight, muscle fiber proportion, Citrate Synthase (CS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity.

Results: HS animals showed a reduction in muscle weight in soleus muscle at 30d, an increase of type I fibers. While EDL muscle of these animals presented at 30d a lower proportion of type IIB fibers and a reduction in LDH activity compared NS group. EDL of HS group at 90d showed a reduction in CS activity. NF group showed a reduction in muscle weight, increase in type I and IIA fibers and increased CS in the EDL muscle at 30d. At 90d increase proportion of fibers type IIB in EDL were observed in NF group. However at 90d HF group showed an increase in IIA fibers in the EDL muscle, accompanied by an increase in CS activity compared to HS pups.

Conclusion: Neonatal fluoxetine administration in rats exposed to a High-fat/hypercaloric maternal perinatal diet induce changes in skeletal muscle phenotype.

Keywords: Skeletal muscle. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. High-fat Diet. Cell Plasticity.

1 INTRODUCTION

Most prevalent disease in humans has been linked to low birth weight [1], [2]. The concept that fetus responds to environmental influences changing the phenotype consists in a phenomenon called developmental plasticity [3], [4]. During the critical period of development maternal nutrition has been related as the main factor to change physiological and morphological states in response to an adverse environment [5], [6]. Studies showed that this alteration causes an increase the risk of development hypertension, diabetes, obesity and metabolic syndrome [7], [8].

During gestational and suckling period consumes an excess of saturated fat and hypercaloric diet may cause systemic inflammation [9], [10]. Consequences on uterus growth, low birth weight, delay on reflex ontogenesis, impaired breastfeeding during suckling and consequences in the behavior and body systems in offspring [11], [12]. Skeletal muscle development during embryogenic development has been studying during last decade to understanding the role of this tissue in development altered metabolic states [5], [13]. In most mammals skeletal muscle comprises a large body mass and have the characteristic to adapting a variety of external stimuli, including substrate availability [9]. Some evidence shows structural and metabolic adaptations in skeletal muscle due to the high-fat dietary behavior in the critical period of the skeletal muscle development [14]–[16].

Obese rats offsprings also present glucose intolerance and muscle dysfunction [17], [18]. In addition, it is seen that the maternal diet rich in fat alters the availability of energy substrate for performance of muscle functions [9]. Thus the reduced contractile capacity in the muscle of animals exposed to nutritional insult during a critical period of development may be through energy-dependent function characteristic in this tissue [9]. Changes in muscle fiber distribution and changes in muscle oxidative capacity may reflect impaired metabolic status of skeletal muscle [19]. Animals studies showed that later in life rodents present glucose intolerance, insulin resistance and impaired feed behavior after programming with maternal high fat diet consumption [17], [18], [20]. However, the molecular and cellular events that regulate skeletal muscle plasticity, as well as the relationship of skeletal muscle fiber composition in adverse maternal nutrition conditions and predisposing to certain chronic disease states remain unclear.

In addition to nutritional aggressions, pharmacological influences during gestation and lactation can lead to permanent morphological and functional changes, including behavioral expression. [21], [22]. Women are commonly exposed to antidepressants during pregnancy and postpartum [23], [24]. Serotonin (5-HT) is seen to

play a key role in developmental stages such as cell proliferation, migration, differentiation and morphogenesis in the regulation of neural tissue growth, as well as interfering in the development of other systems [25]. Thus, manipulation of the serotonergic system is seen as impacting central and peripheral functions and has been studied as a target for the treatment of obesity and metabolic disorders [26]. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are the most prescribed class of antidepressant medication in women of childbearing age, pregnant women and in breastfeeding women [23], [27]. Changes related to the development of the fetus as well as the effects in the early phase of life need to be investigated [21]. In neonate rats, SSRI manipulation induces weight reduction, food consumption, delay in somatic maturation, and behavioral changes. Interestingly, these effects were observed even in adulthood [24], [28], [29].

Previous studies have shown that neonatal exposure to SSRIs has reduced the growth of the heart with a reduction in the area and perimeter of cardiac cells [28]. A similar effect was observed in the skeletal muscle, which showed a reduction in the cross-sectional area of the soleus and gastrocnemius muscle in the early and late stages of the life of rats treated with fluoxetine during lactation [21], [30]. Manipulation of serotonin system early in life is associated with a better adaptation to a hypercaloric diet in adult rats, such as less accumulation of white adipose tissue [21]. Metabolic changes associated with SSRIs use are seen to have protective effects through the decrease of the oxidant damage in the neuronal, cardiac and skeletal muscle tissues [30]–[33].

In this context, we hypothesized that Inhibition of serotonin reuptake maintains the rate of slow type fibers in skeletal muscle and the enzymatic activity of citrate synthase in rats exposed to a high-fat hypercaloric perinatal maternal diet. We aimed to assess the repercussions of neonatal serotonin reuptake inhibition on muscle fiber typology and enzymatic activity in skeletal muscle of rats submitted to or not to the high-fat hypercaloric diet during gestation and lactation.

2 METHODS

Animal and Experimental groups

Twenty virgin female Wistar rats were placed under a 12-h light/dark cycle (lights on at 8 AM), with food and water *ad libitum*. They were mated in a proportion of two females for one male. After confirmation of mating, dams were allocated according to diet manipulation. Pregnant dams were fed either a Normolipidic/Normocaloric diet (NN 354,65 Kcal/100g) or a High-fat/Hypercaloric diet (HH 483,93 Kcal/100g calories from saturated fats) until the end of the lactation period. Diets were prepared in Nutrition Department of Federal University of Pernambuco (Brazil) and their composition is described on Table 1. After birth, litter size was adjusted to eight pups per dam. During suckling period (1st–21st postnatal day) male animals received a daily dose of fluoxetine (10mg/kg) or a placebo (NaCl 0,9%, 10 ml/Kg) intraperitoneally, compose the groups, NS, n=16 (pups from control mother treated with saline); NF, n=16 (pups from control mother treated with fluoxetine); HS, n=16 (pups from high-fat hypercaloric diet exposed mother treated with saline) and HF (pups from high-fat hypercaloric diet exposed mother treated with fluoxetine). At weaning pups were fed with standard chow until 30 days old or 90 days old. Animal procedures were in accordance of international guidelines of animal use and regulation of the ethical committee of animals use of the Federal University of Pernambuco through the protocol number 0027/2016.

Measurement of body weight and food intake

Body weight of dams was recorded once a week during gestation and lactation period. Food intake of mother's rats was evaluated from the first day after pregnancy confirmation, weekly, until the end of the lactation period and was given by the difference between supply and reject in grams. The body weight of pups was recorded daily during the suckling period. These measurements were assessed again at 30, 60 and 90 days old. Body weight gain in pups were calculated after weaning through formula $WG\% = [\text{final weight (g)} \times 100 / \text{initial weight (g)}] - 100$.

Killing and muscle sampling

Animals were killed under *ad libitum* feeding conditions by decapitation at 30 and 90 days old to collect muscle samples. Extensor digitorum Longus (EDL) and the soleus muscle were carefully dissected and immediately frozen in dry-ice cold and kept at -80°C until analysis.

Histochemical evaluation

Soleus and EDL obtained from 30 and 90 days old rat were weighted and frozen in n-Hexane cooled by dry ice. In order to determine the skeletal muscle fiber type, the cryosections were cut in 10 μm using a cryostat microtome and stained for myosin adenosine triphosphatase (mATPase) [34]. The proportion of each fiber type was determined in each section of the soleus and EDL muscles using a photomicroscope photograph and image software (Olympus Optical U-CMAD-2, Tokyo, Japan; 10x objective lens). Muscle fibers were classified into types I and II based on the presence (type I) or absence (type II) of staining for ATPase after acid pre-incubation

at pH 4.3. Using a different set of muscle sample fibers were further classified as type IIa or IIb using as criteria differences in staining intensity or ATPase after acid pre-incubation at pH 4.55. To cell counting, Mensurim 6 (Jean-François Madre-Amiens) was used.

Enzymatic Assays

Enzymatic activity was determined as described previously [30]. Briefly, for an enzymatic analysis, an individual homogenization of the soleus and extensor digitorum longus muscle was performed. The citrate synthase activity was in a reaction mixture containing (in mmol/L) 50 Tris·HCl (pH 8.1), 1 MgCl₂, 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) ($3 = 13.6 \text{ 1mol}/(\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1})$), 3 acetyl-CoA, 5 oxaloacetate and 0.3 mg/mL homogenate. The citrate synthase activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 412nm over an interval of 160 seconds [30].

For the dosage of lactate dehydrogenase, assay buffer containing 50 mM potassium phosphate pH 7.4 and 25 ° C, 6 mM NADH and 23 mM sodium pyruvate (both diluted in buffered water-diluted potassium phosphate buffer in distilled water at 1:10 ratio) and added approximately 200 µg of the sample. The final pH of the assay volume was 2 ml and the pH 7.3. The total volume of the assay was 1 ml and the reading was performed over a 60-second interval in a spectrophotometer at 340 nm. The results were expressed as mmol / mg protein / minute [35].

Statistical Analysis

All results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0. Normality test was assessed by Kolmogorov-Smirnoff. Comparison within groups was performed by 2-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test for multiple comparisons. Student t-test was also used to assess significant differences between groups.

3 RESULTS

Body Weight and food intake of dams

In the third week of gestation pregnant dams exposed to the experimental diet presented a reduction in body weight (NN = $331.4 \pm 7.65\text{g}$, $n = 10$ vs. HH = $308.8 \pm 6.32\text{g}$, $n = 10$, $p < 0, 05 *$). This reduction was observed in the second (NN = $274.6 \pm 5.07\text{g}$, $n = 10$ vs. HH = $250 \pm 8.74\text{g}$, $n = 10$, $p < 0.05 *$) and in the third week of lactation (NN = $274.94 \pm 7.65\text{g}$, $n = 10$ vs. HH = $242.5 \pm 4.31\text{g}$, $n = 10$, $p < 0.05 **$) (Figure 1).

The weekly food consumption evaluated showed lower intakes in grams in the HH group during the whole experimental period compared to the control ($p < 0.01 **$, $p < 0.001 ***$), however, there was no difference in caloric intake between the groups in the first, second and third weeks of gestation (first week NN = $579 \pm 26.82 \text{ kcal}$, $n = 10$ vs. HH = $555.2 \pm 16.81 \text{ kcal}$, 2nd week NN = $661.1 \pm 38.45 \text{ kcal}$, $n = 10$ vs. HH = $651.7 \pm 29.14 \text{ kcal}$, 3rd week NN = $725 \pm 36.14 \text{ kcal}$ vs. $724.2 \pm 23.85 \text{ kcal}$, $P < 0.05$) as well as throughout the lactation period week NN = $742.1 \pm 33.81 \text{ kcal}$ vs. HH = $733.3 \pm 29.39 \text{ kcal}$, $n = 10$, 2nd week $1174 \pm 32.8 \text{ kcal}$ vs. HH = $1069 \pm 75.32 \text{ kcal}$, $n = 10$, Week 3 NN = $1377 \pm 40.33 \text{ kcal}$, $n = 10$ vs. HH = $1227 \pm 76.35\text{kcal}$, $P < 0.05$) (Figure 2).

Body Weight in offspring

At birth offspring from the pregnant exposed to the experimental diet high in fat and carbohydrates were born with reduced weight (NN = $6.64 \pm 0.10 \text{ g}$, $n = 16$ vs. HH = $6.16 \pm 0.11 \text{ g}$, $n = 16$; $* p < 0.01$). In the first week of the lactation period HS group presented weight reduction (5th day of lactation NS = $11.75 \pm 0.3 \text{ g}$, $n = 16$ vs. HS = $9.55 \pm 0.28 \text{ g}$, $n = 16$, $\& = P < 0.001$), this remained reduced until the 21st day of lactation (21st day NS = $37.52 \pm 1.46 \text{ g}$, $n = 16$ vs. HS = $27.85 \pm 0.90 \text{ g}$, $n = 16$, $\& = P < 0.0001$). In the 11 th postnatal period of the nourished pups treated with fluoxetine presented reduced weight (NS = $22.42 \pm 0.52 \text{ g}$, $n = 16$ vs. NF = $19.66 \pm 0.71 \text{ g}$, $n = 16$) this effect remained until the 21 ° day of lactation (NS = $37.52 \pm 1.46 \text{ g}$, $n = 16$ vs. NF = $30.00 \pm 0.94 \text{ g}$, $n = 16$). On the other hand, in the offspring exposed to the experimental maternal diet, administration of fluoxetine during neonatal period reduced the weight from 13th postnatal day until the end of lactation (day 13, HS = $25.40 \pm 0.33 \text{ g}$, $n = 16$ vs. HF = 17 , $N = 16$ vs. HF = $22.03 \pm 0.66 \text{ g}$, $n = 16$, $P < .05 \text{ g}$, $n = 16$, $P < 0.001$, 0.001). At 30 days old offspring of the HS group presented reduced weight (NS = $79.74 \pm 1.75 \text{ g}$, $n = 16$ vs. HS = $60.62 \pm 1.64 \text{ g}$, $n = 16$). The effect of neonatal treatment with fluoxetine on pups body weight reduction was observed at 30 days old in the nourished pups (NS = $79.74 \pm 1.75 \text{ g}$, $n = 16$ vs. NF = 62.89 ± 1 , ($N = 16$) and HF = $50.61 \pm 1.85 \text{ g}$, $n = 16$). At 60 days old there was no statistical difference between the group, however at 90 days body weight reduction was observed in the HS group (NN = $347.1 \pm 6.46 \text{ g}$ vs. HS = $307.8 \pm 6.74 \text{ g}$, $n = 8$) and nourished pups that receiving fluoxetine during neonatal period (NN = $347.1 \pm 6.46 \text{ g}$, $n = 8$ vs. NF = $306.2 \pm 10.75 \text{ g}$, $n = 8$). At 90 days, the HF group did not present reduced body weight compared to their control (HS =

307.8 ± 6.74 g, n = 8 vs. HF = 296.9 ± 4.87 g, n = 8) (Figure 3). Animals from HS group showed elevated weight gain in 30-60 days interval (NS = 235,8 ± 16,95 %, n=8 vs. HS = 299,3 ± 20,15 %, n=8, P<0,01) (Figure 4).

Muscle Weight

At 30 days the EDL muscle showed no difference in weight between groups. While at 90 days, weight loss was observed in the EDL of the nourished group treated with fluoxetine (NS = 0.144 ± 0.001 g, n = 8 vs. NF = 0.108 ± 0.002 g, n = 8, p <0.001). In the soleus muscle at 30 days of life, muscle weight reduction was observed in the group of HS pups compared to their control (NS = 0.031 ± 0.001 g, n = 8 vs. HS = 0.022 ± 0.001 g, P <0.001). At this age neonatal administration with fluoxetine was able to reduce muscle weight in the NF group as well as in the HF group compared to its respective control (NS = 0.031 ± 0.001 g, n = 8 vs. NF = 0.020 ± 0.000 g, n = 8, P <0.001, HS = 0.022 ± 0.001 g vs. HF = 0.015 ± 0.001 g, n = 8, P <0.001). The muscle weight reductions observed at 30 days remained between the groups at the age of 90 days, except in the HF group. The HS group had a reduction in muscle weight compared to control (NS = 0.171 ± 0.007 g vs. HS = 0.139 ± 0.004 g, n = 8, P <0.001). Neonatal administration with fluoxetine also maintained the effect at this age, reducing weight in the nourished group (NS = 0.171 ± 0.007 g vs. NF = 0.136 ± 0.006 g, n = 8, P <0.001) (Figure 5).

Proportion of muscle fibers

At 30 days, the animals exposed to the hyperlipidic and hypercaloric perinatal maternal diet increased the proportion of type I fibers in the soleus muscle (NS = 83.22 ± 1.71%, n = 5 vs. HS = 88.52 ± 1.44 %, n = 5; P <0.05) (Figure 16A). Consequently reduction in the II fibers was observed in the HS group (NS = 16.77 ± 1.71 VS. HS = 11.59 ± 1.32). Neonatal administration of fluoxetine did not cause a change in the proportion of type I fibers in the soleus muscle compared to its control at 30 days of age in normonutrient animals (NS = 83.22 ± 1.71%, n = 5 vs. NF = 84, 8 ± 1.14%, n = 5), as well as in infants exposed to maternal diet and receiving neonatal administration with fluoxetine compared to their control (HS = 88.52 ± 1.44%, n = 5 vs. HF = 90.74 ± 1.89%, n = 5). In the evaluation of fast fiber subtypes, type IIB fibers were not found in the soleus muscle. At 90 days of age, the soleus muscle contained 95.3 ± 1.44% of type I fibers, at that age no differences were observed between groups (NS = 95.3 ± 1.44%, n = 5 vs. NF = 95.42 ± 1.39%, n = 5, HS = 95.71 ± 0.69%, n = 5 vs. HF = 95.81 ± 0.42%, n = 5) (Figura 6).

In the EDL muscle, animals exposed to the a high-fat and hypercaloric maternal diet presented a reduction in type IIB fibers at 30 days old (NS = 29.21 ± 2.54 vs. HS = 21.53 ± 0.72, n = 5, P<0,05). Neonatal administration with fluoxetine caused an increase in the proportion of type I fibers at 30 days old in the nourished group (NS = 11.91 ± 2.153, n = 5 vs. NF = 14.88 ± 1.15, n = 5; P <0.05). This increase was also confirmed at pH 4.55. The EDL muscle of the nourished animals and exposed to fluoxetine in the neonatal period, presented an increase in type IIA fibers compared to their control (NS 59.73 ± 2.11%, n = 5 vs. NF = 69, 79 ± 1.79%, n = 5, P <0.05) and a reduction of type IIB fibers compared to its control (NS = 29.21 ± 2.54 vs. NF = 12.65 ± 2.10 %, n = 5, P <0.05). These changes were not observed in the HF group, which presented a type IIA similar to control (HS = 65.33 ± 0.90%, N = 5 vs. HF = 66.15 ± 2.66%, n = 5) and type IIB (HS = 21.53 ± 0.72, n = 5 vs. HF = 22.72 ± 2.45%, n = 5) at 30 days old (Figure 7).

In young adult animals, EDL presented 5.02 ± 0.25% of type I fibers. At this age, no difference was found between groups in relation to the proportion of type I fibers. However, in the evaluation of type II fiber subtypes this presented an increase of IIA fiber type (H = 26.62 ± 1.53, n = 5 vs. HF = 32.73 ± 1.43, n = 5, p <0.05) and a reduction in type IIB fibers of the HF group compared to their control (HS = 68.39 ± 1.91, n = 5 vs. HF = 61.54 ± 1.63, n = 5, P <0.05). At this age the group of nourished rats treated with fluoxetine in the neonatal period had a higher proportion of type IIB fibers (NS = 63.26 ± 1.61%, n = 5 vs. NF = 68.42 ± 1.49% n = 5; p <0.05) (Figure 7).

Enzimatic activity

At 30 days old the activity of citrate synthase in nourished pups that received neonatal administration of fluoxetine was reduced compared to their control (NS = 3.23 ± 0.34 mM / mg prot, n = 4 vs. NF = 1.55 ± 0.19 mM / mg prot, n = 7, P <0.05). While LDH activity was reduced in the soleus muscle of pups exposed to the HH perinatal diet and treated with saline (NS = 0.184 ± 0.037 mM / mg prot, n = 5 vs. HS = 0.070 ± 0.010 mM / mg prot, n = 7, P <0.05). While LDH activity was reduced in the soleus muscle of pups exposed to the HH perinatal diet and treated with saline (NS = 0.184 ± 0.037 mM / mg prot, n = 5 vs. HS = 0.070 ± 0.010 mM / mg prot, n = 7, P <0.05). Neonatal administration with fluoxetine caused a reduction in LDH activity in the soleus muscle of nourished pups compared to control (NS = 0.184 ± 0.037 mM / mg prot, n = 5 vs. NF = 0.105 ± 0.005 mM / mg prot, n = 7, P <0.01). At 90 days old CS activity in the soleus was reduced in the neonatal chicks treated with

fluoxetine in the neonatal period compared to their control (NS = 44.47 ± 2.08 U / mg prot, n = 5 vs. NF = $34, 57 \pm 3.87$ U / mg prot n = 6, P <0.05) (Figure 8).

In EDL muscle at 30 days old, LDH activity in the group of pups from the rats exposed to the HH diet was reduced (NS = 0.263 ± 0.022 mM / mg prot, n = 7 vs. HS = 0.149 ± 0.007 mM / mg prot, n = 6, P <0.01). The neonatal administration with fluoxetine in nourished group had a reduction in LDH activity (NS = 0.263 ± 0.022 mM / mg prot, n = 7 vs. NF = 0.186 ± 0.013 mM / mg prot, n = 6, P <0.05). Pups exposed to the HH maternal diet in the perinatal period showed no alteration in LDH activity in the EDL muscle (HS = 0.149 ± 0.007 mM / mg prot, n = 6, P <0.01 vs. HF = 0.159 ± 0.017 mM / mg prot, n = 7, P > 0.05). Citrate synthase showed an increase in EDL muscle at 30 days in neonatal fluoxetine treated pups in the neonatal period (NS = 1.43 ± 0.88 U / mg prot, n = 5 vs. NF = $3.51 \pm 0, 74$ U / mg prot, n = 5, P <0.01). However, the activity remained similar to control in the offspring exposed to perinatal maternal diet HH and treated with fluoxetine in the neonatal period (HS = 2.34 ± 0.16 U / mg prot, n = 5 vs. HF = $1.29 \pm 0, 19$ U / mg prot, n = 5) (Figure 9).

At 90 days old in the EDL muscle a reduction in LDH activity was observed in the nourished animals treated with fluoxetine in the neonatal period (NS = 7.63 ± 0.37 mM / mg prot, n = 5 vs. NF = 7.31 ± 0.32 mM / mg prot, n = 5, P > 0.05). While the CS activity was reduced in the HS group compared to the control (NS = 42.74 ± 3.8 U / mg prot, n = 4 vs. HS = 24.65 ± 2.57 U / mg prot, n = 5, P <0.01). Also at this age CS had a reduction in activity in the group of nourished animals treated with fluoxetine in the neonatal period (NS = 42.74 ± 3.8 U / mg prot, n = 4 vs. NF = 17.86 ± 3.32 U / mg prot, n = 5, P <0.05). Interestingly, pups exposed to the HH perinatal maternal diet and treated with fluoxetine in the neonatal period had increased CS activity compared to their HS control (HS = 24.65 ± 2.57 U / mg prot, n = 5 vs. HF = 37.25 ± 1.38 U / mg prot, n = 4, P <0.01), exhibiting similar behavior with nourished animals receiving saline (Figure 9).

DISCUSSION

Here we show that the exposure to a High-fat and hypercaloric perinatal maternal diet caused implications in muscle tissue of rats even in adulthood. Confirming our hypothesis, that neonatal administration with fluoxetine could maintain the proportion of oxidative fibers and enzymatic activity of citrate synthase in adult rats exposed to High-fat/hypercaloric maternal perinatal diet. In short-term, the soleus muscle under maternal diet influence had highest proportion of type I fibers at 30 days, while at 90 days there was homogeneity in the proportion between the groups. The EDL at 30 days had a reduction of type IIB fibers in pups exposed to a High-fat/Hypercaloric maternal perinatal diet. Neonatal administration with fluoxetine increased the proportion of type I and IIA fibers in nourished pups compared to those that received saline. Whereas at 90 days offspring exposed to a high-fat/hypercaloric maternal perinatal diet presented an increase in the proportion of the fibers type IIA in EDL muscle of animals that receive neonatal fluoxetine administration. Therefore, our results indicate alteration of oxidative capacity and glycolytic enzymatic activity in the soleus muscle and EDL in short and long-term.

We observed that pregnant rats of experimental group showed a lower body weight at the end of gestation and during lactation period than damns fed with a control diet. Similar to other studies that observed no weight gain during perinatal period after exposure to a high-fat diet [36], [37]. Our study showed reduced intake of diet in grams in damns that consumed the experimental diet in the perinatal period, although no differences in caloric intake throughout the period were observed. The effect of saturated fat consumption seems to have a greater capacity to cause satiety and may be related to increased levels of peptide hormone YY [38]. As the gestational and lactation period is characterized by high energy demand, poor nutrition may have contributed to lower body weight observed in the rats that consumed the experimental diet [39].

Low birth weight observed in pups from damns exposed to a High-fat diet corroborates of the study by de Cunha, Molle, Portella (2015), the authors observed a similar effect after exposure to a high-fat diet. Restriction of uterine growth, preterm birth, low birth weight and delay in reflex ontogeny are outcomes reported in the literature after exposing the offspring to a high-fat maternal diet [11], [12], [40]. Maternal intake of fatty acids is passed to the fetus and newborn through the placenta and through breast milk respectively [41]. The imbalance caused by ingestion of saturated fat can result in permanent changes in appetite control, neuroendocrine functions and fetal energy metabolism affecting the development [41]. The impact of offspring body weight can also occur due to the influence of diet on the development of the mammary gland and lactogenesis influencing the volume of breast milk consequently impair the development of offspring [42]. Evidences has linked intense weight gain in adolescence with an increased risk of developing obesity and metabolic disorders [43]–[45]. Here we show that the pups exposed to the high perinatal maternal diet presented higher weight gain during this period. The effects of low birth weight are intensified when followed by growth retardation and weight gain in adolescence[13]

The present study showed the effects of neonatal treatment with fluoxetine in nourished pups or exposed to a high-fat and hypercaloric perinatal maternal diet. Reduction of body weight, were observed during the lactational period and even in the later stage of life in the nourished pups exposed to the neonatal treatment with fluoxetine. In a previous study, weight loss and growth retardation were observed in animals exposed to SSRI during lactation [46], [47]. Interestingly, pups exposed to the HH maternal diet and treated with fluoxetine in the neonatal period did not show a reduction in weight at 90 days of age, compared to their control. Manipulation of serotonin system may play an important role in relief obesity and metabolic disorders by increasing muscle energy consumption[48]

The main finding of this study was to observe the alteration of muscle phenotype in short and long-term in rats exposed to high-fat and hypercaloric perinatal maternal diet that received neonatal administration of fluoxetine. Muscle weight reduction, alteration in the fiber proportion and the enzymatic activity of citrate synthase and lactate dehydrogenase in the soleus and EDL muscle were presented here. Maternal nutrition has an important role in muscle development and metabolic functions in the offspring [49]. Our study showed in the soleus muscle in young rats with a proportion of 83.2% of type I fibers and in adult rats about 5% of type II fibers. Melichna et al., 1987 showed similar proportions in 35-day-old Wistar rats determined by mATPase activity. In adult rats studies showed rodents with proportions between 93.1 and 96.1% of type I fibers in soleus (LEWIS et al., 1994; SOUKUP, ZACHAROVÁ, 2002).

In the soleus muscle in the postnatal period there is a natural increase of type I fibers due to the transformation of type IIA fibers [52]–[54]. Here the diet seems to have interfered in this process. In response to maternal diet, the soleus muscle presented at 30 days reduced muscle weight and increased the proportion of type I fibers. The muscle mass reduction process is a specific occurrence for IIA / IIX and IIX fibers, that is, they are restricted the glycolytic fast-twitch fibers (GOSKER et al., 2002; WANG; PESSIN, 2013). Reduction in the expression of MYOD1 may have caused a reduction in the number of myogenic cells, affecting muscle development, thus maternal malnutrition during gestation and lactation capable of altering the contractile capacity of the offspring muscle [9].

The EDL muscle at 30 days presented a similar proportion of type IIB fibers compared to the proportions of the study by Melichna et al. (1987) (29.3% vs. 34.1%). While at 90 days presented a greater predominance of type IIB fibers in the EDL muscle, corroborating with previous studies (SOUKUP, ZACHAROVÁ, 2002; YU et al., 1998). Here we showed that the maternal diet HH caused in the offspring at the age of 30 days an increase in type IIA and reduction in the type IIB fibers of EDL. Wang E Pessin, (2013) argued that type IIB fibers are more susceptible to the process of muscle loss, stating that this process is related to low body weight. However, the mechanisms that justify this occurrence remain obscure.

In previous studies authors have shown that the low protein intake during a critical period of development alters skeletal muscle structure, function, and metabolism of the offspring [28], [58], [59]. Authors observed in young adult rats an increase in the proportion of type IIB fibers. In animals with 70 days of age protein restriction caused an increase in type II fibers in the soleus muscle [58]. However, corroborating with our findings the soleus muscle of young adult rats, did not present differences in fiber proportions due to maternal malnutrition in the perinatal period [58]. However, in one study the authors showed a decrease in type IIB fibers in the masseter muscle in malnourished rats [59]. As fat consumption or protein restriction causes a reduction in nutrient intake, in the perinatal period this influence causes lasting consequences on the skeletal muscle, especially in the proportion of type IIA or IIB fibers [60].

To our knowledge, this was the first study to show the effects of neonatal treatment with fluoxetine in rats exposed or not to the high fat perinatal maternal diet on the proportion of fibers. We showed that at 30 days the nourished and fluoxetine-treated pups presented an increase in the percentage of type I fibers, while there was an increase in type IIA and reduction in type IIB in the EDL muscle compared to control. At 90 days, there was a higher proportion of type IIB fibers in this same muscle. At 90 days, pups exposed to a high fat and fluoxetine-treated maternal diet in the neonatal period showed an increase in type IIA fibers.

In a study using intraperitoneal 5-HT, there was an induction in the change of the profile of glycolytic muscle fibers to oxidative muscle fibers in the soleus muscle of rats [61]. In addition, there was an increase in the expression of PGC-1 α -b and c mRNA and genes related to fatty acid oxidation in the skeletal muscle of mice It is important to note that we observed these changes in the EDL muscle of pups treated with fluoxetine. Increasing the expression of PGC-1 α , b or c is related to increased gene expression involved in mitochondrial biogenesis and increased fatty acid oxidation [62].

In agreement with our findings, authors showed reduction of muscle weight in the late phase after neonatal treatment with fluoxetine, in addition, they showed a reduction in the number of myonucleus in the soleus muscle and a reduction of the cross-sectional area of the muscle at 30 and 90 days of age [29]. In our study, neonatal fluoxetine treatment in pups exposed to a maternal high-fat diet presented at 90 days of age a lower

proportion of type IIB fibers in relation to their control, and consequent increase in type IIA fibers in the EDL muscle. According to the finding of authors who showed that serotonin may induce a change from glycolytic to oxidative metabolism in skeletal muscle [61].

Deficiencies in mitochondrial content and function are seen to play a role in the postnatal development of metabolic diseases. Recent evidence has shown that certain antidepressants are capable of altering the antioxidant capacity in a number of different systems [30], [32], [63], [64]. Here we show different levels of enzymatic activity in citrate synthase and lactate dehydrogenase due to exposure to a high fat perinatal maternal diet in treated or untreated fluoxetine. The activity of citrate synthase is strongly associated with mitochondrial content in the skeletal muscle [65]. We observed that in the soleus muscle citrate synthase did not present change due to exposure to the maternal HH diet. The oxidative capacity in the muscle correlates with the oxygen consumption and energy demands [66]. The soleus muscle is characterized by high oxidative capacity due to the higher density of mitochondria, a greater presence of slow oxidative fibers and fast glycolytic-oxidative fibers [51]. Therefore, due to this oxidative predominance, reductions in CS activity, which is a marker of oxidative metabolism, require greater stimulation for its occurrence [67]. In one study it was observed that consumption of a high-fat diet for five weeks did not alter citrate synthase activity in the soleus muscle of adult rats, suggesting that the adaptations to higher lipid intake occur through fiber-specific mechanisms, with different deficits occurring in fast and slow fibers in skeletal muscle [16]. Protein restriction in the perinatal period also did not alter citrate synthase activity in the soleus muscle and EDL of young offspring [58].

A body of evidence shows that fat consumption affects the mitochondrial oxidative capacity in the skeletal muscle [12], [68]–[70]. In a muscle with glycolytic characteristics, authors showed that citrate synthase activity increased in the plantar muscle of animals after four weeks of high-fat diet consumption [71], [72]. Here we showed that the EDL muscle of rats exposed to a maternal diet high in fat and carbohydrates presented a reduction in the activity of citrate synthase at 90 days of age. The reduction of mitochondrial function has been proposed as a risk factor for the development diabetes [73]. Moreover, the reduction of mitochondrial ability to oxidize fatty acids is seen as the main cause of intramuscular accumulation of lipids and their subsequent deleterious effects on insulin action [74]. Interestingly, the animals exposed to the high-fat mother's diet and treated with fluoxetine in the perinatal period did not present this reduction. Confirming our hypothesis, citrate synthase would maintain levels of activity in adult animals treated with fluoxetine in the neonatal period. This effect seems to be related to the increase in type IIA muscle fibers observed in this group of adult animals.

We showed in this study that in nourished animals fluoxetine was able to increase the citrate synthase activity in the EDL muscle. The activity of CS synthase is generally related to the population of type IIA fibers, followed by type I fibers [75]. This finding may be related to the increase in the proportion of type IIA and type I fibers in the EDL muscle of neonatal nourished and treated with fluoxetine in the neonatal period. In another study, it was seen that even at 60 days of age, increased citrate synthase activity was shown in the EDL muscle of rats exposed to fluoxetine during lactation [30]. Although we showed that at 90 days this effect was not observed.

Skeletal muscle has considerable metabolic flexibility, therefore it predominantly contains the muscle-specific isoenzyme of LDH. In humans, glucose synthesis and degradation disorders, with consequent accumulation of glycogen, affect the skeletal muscle, decreasing LDH activity [76]. LDH activity is decreased in muscle with a higher proportion of type I fibers (SJODIN, 1976; TAKASU; HUGHES, 1969). In agreement with our findings that showed higher LDH activity in the EDL muscle compared to the soleus. In the offspring exposed to the maternal high fat and carbohydrate perinatal diet at 30 days of age, lactate dehydrogenase was reduced in the soleus muscle and EDL muscle compared to the control group. LDH reduction was also observed in nourished animals treated with fluoxetine in the neonatal period. Interestingly, even at 90 days of age the nourished and fluoxetine-treated pups maintained the reduction of this enzyme in the EDL muscle. In agreement with our findings that showed higher LDH activity in the EDL muscle compared to the soleus. In the offspring exposed to the maternal high fat and carbohydrate perinatal diet at 30 days of age, lactate dehydrogenase was reduced in the soleus muscle and EDL muscle compared to the control group. LDH reduction was also observed in nourished animals treated with fluoxetine in the neonatal period. Interestingly, even at 90 days of age the nourished and fluoxetine-treated pups maintained the reduction of this enzyme in the EDL muscle.

The consumption of 45% saturated fat in the diet did not show differences in CS activity nor alterations in LDH activity in the soleus muscle of rats with 150 days of age [18]. Although they suggested the higher capacity of skeletal muscle to use fatty acids for energy metabolism, due to the increase of Carnitine Palmitoyl transferase 1 [18]. Here we show that at 90 days the offspring of rats consuming the high fat and carbohydrate diet in the perinatal period showed no differences in LDH activity in soleus muscle and EDL. This occurrence suggests that adult glycolytic activity appears to be normalized.

CONCLUSION

In conclusion, maternal consumption of high-fat and hypercaloric diet during gestational and lactational period induced a poor nutritional status in mothers. Offspring showed persistent effects on structure and oxidative capacity in skeletal muscle. This modification could alter muscle function and increase the susceptibility to develop chronic disease. Serotonin manipulation early in life in rats exposed to a high-fat hypercaloric diet during may maintaining body weight and proportion of slow oxidative fibers and fast glycolytic-oxidative fiber in skeletal muscle reflecting on oxidative capacity later in life. Furthermore, more studies are necessary to explain cellular and molecular mechanisms that are involved in skeletal muscle plasticity in consequences of poor nutrition and SSRI exposure during critical period of development.

AKNOWLEDGMENTS

The author's thanks, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for their financial support.

DISCLOSURE

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] D. Barker, "The developmental origins of adult disease.," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 23, no. 6, pp. 588–595, 2004.
- [2] R. C. Laker, M. E. Wlodek, J. J. Connelly, and Z. Yan, "Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences," *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 2, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [3] S. A. Kelly, T. M. Panhuis, and A. M. Stoeckl, "Phenotypic plasticity: Molecular mechanisms and adaptive significance," *Compr. Physiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 1417–1439, 2012.
- [4] A. A. Agrawal, "Ecology: Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5541, pp. 321–326, 2001.
- [5] M. Carolan-olah, M. Duarte-gardea, and J. Lechuga, "A critical review : early life nutrition and prenatal programming for adult disease," pp. 3716–3729, 2015.
- [6] R. Orozco-Solis *et al.*, "Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, 2010.
- [7] E. C. Cottrell and S. E. Ozanne, "Early life programming of obesity and metabolic disease," *Physiol. Behav.*, vol. 94, pp. 17–28, 2008.
- [8] D. J. P. Barker, J. G. Eriksson, T. Forsén, and C. Osmond, "Fetal origins of adult disease : strength of," pp. 1235–1239, 2002.
- [9] S. A. Bayol, S. J. Farrington, and N. C. Stickland, "A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring," *Br. J. Nutr.*, vol. 98, no. 4, pp. 843–851, 2007.
- [10] J. G. Geoghegan, C. A. Cheng, C. Lawson, and T. N. Pappas, "The effect of caloric load and nutrient composition on induction of small intestinal satiety in dogs," *Physiol. Behav.*, vol. 62, no. 1, pp. 39–42, 1997.
- [11] S. Cunha, R. D. Molle, and A. K. Portella, "Both Food Restriction and High-Fat Diet during Gestation Induce Low Birth Weight and Altered Physical Activity in Adult Rat Offspring : The ' Similarities in the Inequalities ' Model," vol. 10, no. 1, pp. 1–18, 2015.
- [12] J. Liu *et al.*, "Intrauterine growth retardation increases the susceptibility of pigs to high-fat diet-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1–13, 2012.
- [13] S. D. Parlee and O. A. MacDougald, "Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no. 3, pp. 495–506, Mar-2014.
- [14] Y. Izumiya *et al.*, "Fast/Glycolytic Muscle Fiber Growth Reduces Fat Mass and Improves Metabolic Parameters in Obese Mice," *Cell Metab.*, vol. 7, no. 2, pp. 159–172, 2008.
- [15] J. Abou Mrad, F. Yakubu, D. Lin, J. C. Peters, J. B. Atkinson, and J. O. Hill, "Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats," *Am J Physiol*, vol. 262, no. 4 Pt 2, pp. R684–8, 1992.
- [16] J. Ciapaite, S. A. van den Berg, S. M. Houten, K. Nicolay, K. Willems van Dijk, and J. A. Jeneson, "Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary fat overload differentially impact fast-versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, no. 2, pp. 155–164, 2015.
- [17] T. Cristina, B. De Jesus, J. Izabel, R. David, and C. Jairza, "A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases

- Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats,” pp. 1071–1074, 2011.
- [18] C. A. Pileggi *et al.*, “Maternal high fat diet alters skeletal muscle mitochondrial catalytic activity in adult male rat offspring,” *Front. Physiol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–11, 2016.
 - [19] T. J. Shortreed, K. E., Krause, M. P., Huang, J. H., Dhanani, D., Moradi, J., Ceddia, R. B., & Hawke, “Muscle-Specific Adaptations, Impaired Oxidative Capacity and Maintenance of Contractile Function Characterize Diet-Induced Obese Mouse Skeletal Muscle,” *PLoS One*, vol. 4, no. 10, 2009.
 - [20] S. A. Bayol, B. H. Simbi, and N. C. Stickland, “A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning,” *J. Physiol.*, vol. 567, no. 3, pp. 951–961, 2005.
 - [21] L. E. Grzeskowiak, A. L. Gilbert, and J. L. Morrison, “Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: Evidence from animal and human studies,” *Reprod. Toxicol.*, vol. 34, no. 1, pp. 101–109, 2012.
 - [22] R. Manhaes De Castro *et al.*, “Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor,” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 121–124, 2001.
 - [23] S. E. Andrade *et al.*, “Use of antidepressant medications during pregnancy: a multisite study,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 198, no. 2, 2008.
 - [24] J. Ø. Berle and O. Spigset, “Antidepressant Use During Breastfeeding,” *Curr. Womens. Health Rev.*, vol. 7, no. 1, pp. 28–34, 2011.
 - [25] G. A. Buznikov, W. H. Lambert, and J. M. Lauder, “Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis,” *Cell Tissue Res.*, vol. 305, no. 2, pp. 177–186, 2001.
 - [26] A. S. Garfield and L. K. Heisler, “Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity,” *J. Physiol.*, vol. 587, no. 1, pp. 49–60, 2009.
 - [27] N. et al. Irena, “NEURODEVELOPMENT OF CHILDREN EXPOSED IN UTERO TO ANTIDEPRESSANT DRUGS,” *new Engl. J. Med.*, pp. 5–9, 2013.
 - [28] A. E. Toscano *et al.*, “Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology?,” *Life Sci.*, vol. 82, no. 21–22, pp. 1131–1136, 2008.
 - [29] V. Caiaffo, A. S. C. Ribeiro, B. D. R. Oliveira, Y. M. L. Albuquerque, and S. R. A. de Moraes, “Histomorphometric Evaluation of Soleus and Lateral,” *Int. J. Morphol.*, vol. 32, no. 3, pp. 751–755, 2014.
 - [30] A. I. da Silva *et al.*, “Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues,” *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 40, no. 6, pp. 565–574, 2015.
 - [31] A. I. da Silva *et al.*, “Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life,” *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 92, no. 4, pp. 330–337, 2014.
 - [32] G. R. F. Braz, C. M. Freitas, L. Nascimento, A. A. Pedroza, A. I. da Silva, and C. Lagranha, “Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart,” *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 41, no. 4, pp. 362–369, 2016.
 - [33] L. C. M. Galindo *et al.*, “Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats,” *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 46, pp. 76–81, 2015.
 - [34] M. H. K. K. K. Brooke, “Muscle fiber types: How many and what kind?,” 1970.
 - [35] J. Reeves, S. Francisco, M. Fimognari, and S. Francisco, “An Improved Procedure for the Preparation of Crystalline Lactic Dehydrogenase from Hog Heart *,” vol. 238, no. 12, 1963.
 - [36] M. A. Shaw, K. M. Rasmussen, and T. R. Myers, “Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats,” *J Nutr.*, vol. 127, no. 1, pp. 64–69, 1997.
 - [37] T. C. Ferro Cavalcante *et al.*, “Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period,” *Lipids*, vol. 48, no. 11, pp. 1157–1168, 2013.
 - [38] A. Kozimor, H. Chang, and J. A. Cooper, “Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety,” *Appetite*, vol. 69, pp. 39–45, 2013.
 - [39] D. J. Naismith and B. L. Morgan, “The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat,” *Br. J. Nutr.*, vol. 36, p. 563, 1976.
 - [40] E. V. Cadena-Burbano *et al.*, “A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats,” *Nutr. Neurosci.*, vol. 8305, no. August, pp. 1–12, 2017.
 - [41] S. Kabaran and T. T. Besler, “Do fatty acids affect fetal programming?,” *J. Heal. Popul. Nutr.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–9, 2015.
 - [42] D. J. Flint, “Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland,” *AJP Endocrinol. Metab.*, vol. 288, no. 6, pp. E1179–E1187, 2005.
 - [43] A. Diemert *et al.*, “Maternal nutrition, inadequate gestational weight gain and birth weight: Results from a prospective birth cohort,” *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, 2016.
 - [44] M. H. Vickers *et al.*, “The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is

- dependent on maternal nutritional status during pregnancy,” *Endocrinology*, vol. 149, no. 4, pp. 1906–1913, 2008.
- [45] D. Barker, J. Eriksson, T. Forsen, and C. Osmond, “Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis,” *Int J Epidemiol*, vol. 31, pp. 1235–1239, 2002.
 - [46] T. C. B. J. Deiró *et al.*, “Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats,” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 37, no. 10, pp. 1503–1509, 2004.
 - [47] T. C. B. J. Deiró *et al.*, “Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats,” *Physiol. Behav.*, vol. 87, no. 2, pp. 338–344, 2006.
 - [48] H. Watanabe *et al.*, “Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, pp. 1–12, 2014.
 - [49] S. Bayol, D. Jones, and G. Goldspink, “Influence of maternal nutrition on post-natal skeletal muscle growth,” vol. 46, p. 2003, 2003.
 - [50] D. Lewis, A. Levi, P. Brooksby, and J. Jones, “A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition,” *Exp. Physiol.*, vol. 79, no. 3, pp. 377–386, 1994.
 - [51] and V. S. Tomás Soukup, Gisela Zacharová, “Fiber type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred lewis rats,” vol. 104, no. 4, pp. 399–405, 2002.
 - [52] K. M. F. T. Barros, R. Manhaes-De-Castro, F. Goubel, and F. Canon, “Differential adaptations during growth spurt and in young adult rat muscles,” *Animal*, vol. 3, no. 1, pp. 72–78, 2009.
 - [53] A. Ruiz-Rosado *et al.*, “Histochemical and morphometric analysis of muscle fiber type transformation during the postnatal development of the chronically food-deprived rat,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 61, no. 5, pp. 372–381, 2013.
 - [54] and C. R. O. P.D. Gollnick, D. Parsons and D., “Histochemistry Differentiation of Fiber Types in Skeletal Muscle from the Sequential Inactivation,” pp. 543–544, 1983.
 - [55] E. M. P. Gosker HR van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM, “Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 76, no. 1, pp. 113–119, 2002.
 - [56] Y. Wang and J. E. Pessin, “Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy,” *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 16, no. 3, pp. 243–250, 2013.
 - [57] F. Yu, H. Degens, X. Li, and L. Larsson, “Gender- and age-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the contractility and myosin composition of single rat soleus muscle fibres,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 437, no. 1, pp. 21–30, 1998.
 - [58] R. da Silva Aragão *et al.*, “Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition,” *Acta Physiol.*, vol. 210, no. 1, pp. 70–83, 2014.
 - [59] D. C. Lacerda *et al.*, “Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats,” *Physiol. Behav.*, vol. 173, 2017.
 - [60] M. J. Zhu, S. P. Ford, W. J. Means, B. W. Hess, P. W. Nathanielsz, and M. Du, “Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring,” *J. Physiol.*, vol. 575, no. 1, pp. 241–250, 2006.
 - [61] H. Watanabe *et al.*, “Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice,” *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2016.
 - [62] S. Miura, Y. Kai, Y. Kamei, and O. Ezaki, “Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to β 2-adrenergic receptor activation and exercise,” *Endocrinology*, vol. 149, no. 9, pp. 4527–4533, 2008.
 - [63] C.-C. Chang, C.-T. Lee, T.-H. Lan, P.-C. Ju, Y.-H. Hsieh, and T.-J. Lai, “Effects of antidepressant treatment on total antioxidant capacity and free radical levels in patients with major depressive disorder,” *Psychiatry Res.*, vol. 230, no. 2, pp. 575–580, 2015.
 - [64] T. Liu *et al.*, “A meta-analysis of oxidative stress markers in depression,” *PLoS One*, vol. 10, no. 10, pp. 1–17, 2015.
 - [65] S. Larsen *et al.*, “Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects,” *J. Physiol.*, vol. 590, no. 14, pp. 3349–3360, 2012.
 - [66] M. Philippi and A. H. Sillau, “Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat,” *J. Exp. Biol.*, vol. 189, pp. 1–11, 1994.
 - [67] K. Schwerzmann, H. Hoppeler, S. R. Kayar, and E. R. Weibel, “Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 1583–1587, 1989.
 - [68] C. Latouche *et al.*, “Maternal Overnutrition Programs Changes in the Expression of Skeletal Muscle Genes That Are Associated with Insulin Resistance and Defects of Oxidative Phosphorylation in Adult,” pp. 237–244, 2014.
 - [69] S. Iossa, M. P. Mollica, L. Lionetti, R. Crescenzo, M. Botta, and G. Liverini, “Skeletal muscle oxidative

- capacity in rats fed high-fat diet,” *Int J Obes*, vol. 26, no. 1, pp. 65–72, 2002.
- [70] J. Hoeks *et al.*, “Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: Effect of high-fat feeding,” *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 4, pp. 510–516, 2008.
- [71] X. Li, K. Higashida, T. Kawamura, and M. Higuchi, “Alternate-day high-fat diet induces an increase in mitochondrial enzyme activities and protein content in rat skeletal muscle,” *Nutrients*, vol. 8, no. 4, 2016.
- [72] A. Silva Cornachione, P. Cação Oliveira Benedi, J. Cristina Polizello, L. César Carvalho, and A. Cláudia Mattiello-Sverzut, “Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats,” *Acta Histochem. Cytochem.*, vol. 44, no. 2, pp. 43–50, 2011.
- [73] B. B. Lowell and G. I. Shulman, “Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes,” *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5708, pp. 384–387, 2005.
- [74] N. Turner *et al.*, “Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: Evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents,” *Diabetes*, vol. 56, no. 8, pp. 2085–2092, 2007.
- [75] M. D. Delp and C. Duan, “Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 80, no. 1, pp. 261–270, 1996.
- [76] S. Tsujino and I. Nonaka, “Glycogen Storage,” vol. 18, no. 1, pp. 125–150, 2000.
- [77] T. Takasu and B. P. Hughes, “Lactate dehydrogenase isozyme patterns in human skeletal muscle. I. Variation of isozyme pattern in the adult,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 32, no. 3, pp. 175–9, 1969.

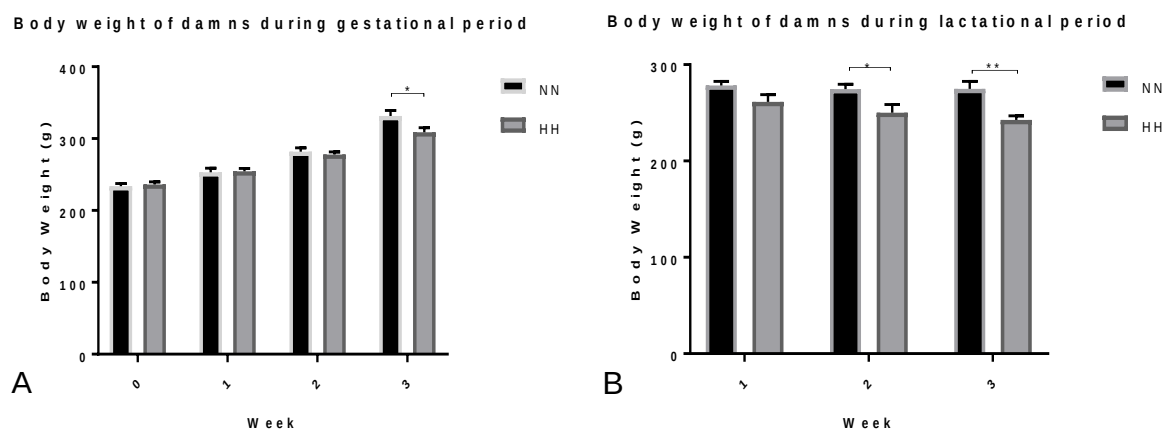


Figure 1. Body weight of dams during gestational and lactational period A) maternal body weight during pregnancy; B) maternal body weight during lactation; Groups according to exposure to maternal diet during gestation and lactation; control diet (NN, n = 10), hyperlipid / hypercaloric diet (HH, n = 10). The values were presented as mean and standard error of the mean. The Anova two-way repeated measures were used to compare the groups

over the time period, followed by Tukey's post hoc test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

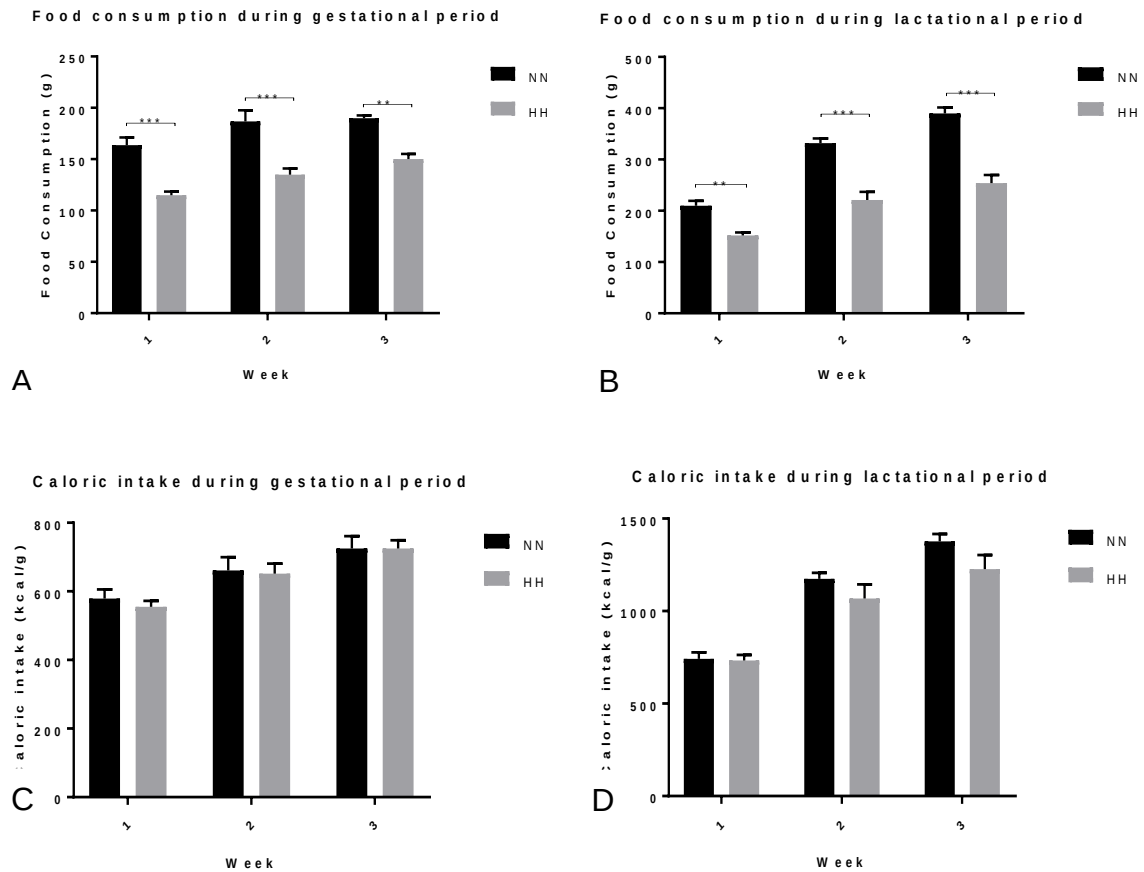


Figure 2. Food consumption and caloric intake of dams during gestational and lactational period. A) Maternal food consumption during pregnancy; B) Maternal food consumption during lactation; C) Maternal caloric intake during pregnancy; D) Maternal caloric intake during lactation. Groups according to maternal diet during gestation and lactation; control diet (NN, $n = 10$), hyperlipid / hypercaloric diet (HH, $n = 10$). The values were presented as mean and standard error of the mean. The Anova two-way repeated measures were used to compare the groups over the time period, followed by Tukey's post hoc test, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

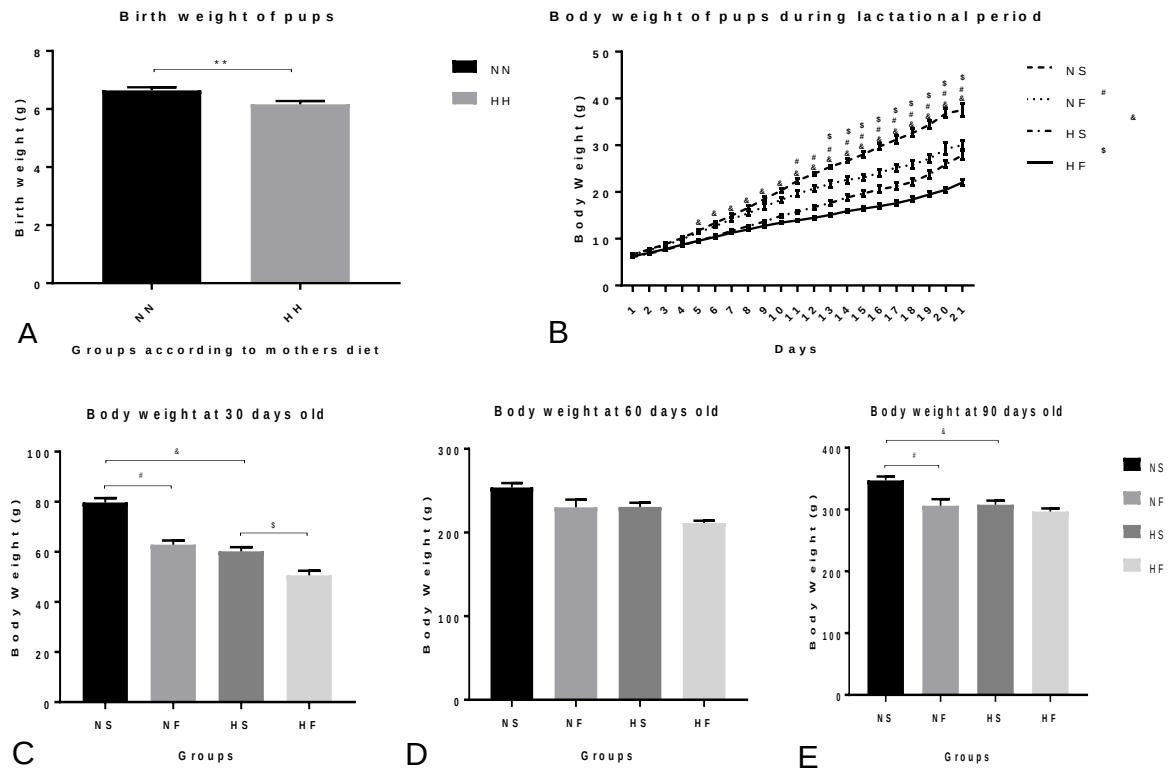


Figure 3. Animals body weight A) at birth, B) during lactation and C) at 30, D) at 60 and E) at 90 days old. Composition of groups according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment: NS (control diet + saline), NF (control diet + fluoxetine), HS (hyperlipidic diet + hypercaloric + saline), HF (hyperlipidic diet + fluoxetine). The values were presented as mean and standard error of the mean. Data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures, followed by the Tukey test. $P < 0.005$. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF.

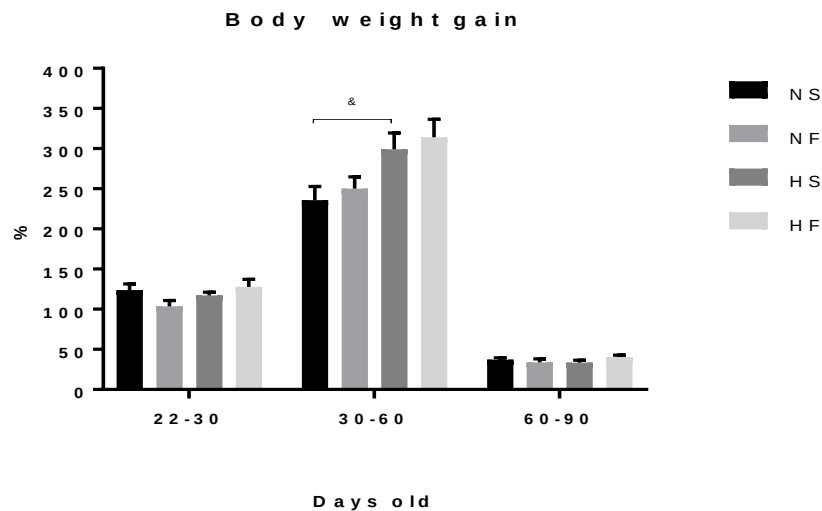


Figure 4. Body weight gain of pups at intervals between 22 and 30 days old; 30 and 60 days old; 60 and 90 days old. NS (Control diet + saline), NF (control diet + fluoxetine), HS (hyperlipid / hypercaloric diet + saline), HF (hyperlipid diet + fluoxetine). The values were presented as mean and standard error of the mean. ANOVA for repeated measures, followed by the Tukey test. $P < 0.01$. & = NS vs. HS.

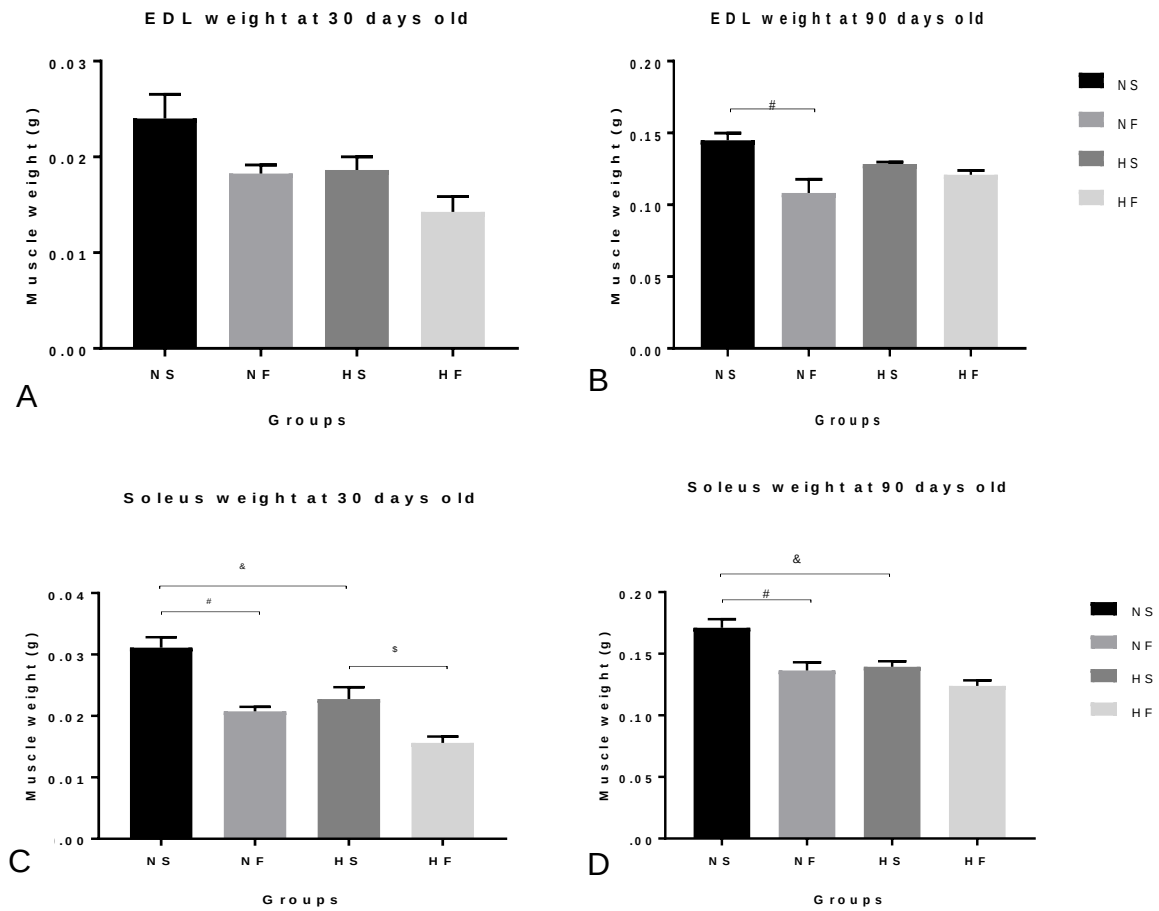


Figure 5. Muscular weight of pups at 30 and 90 days old. A) Weight of the EDL at 30 days old, B) Weight of the EDL at 90 days, C) Weight of the soleus at 30 days, D) Weight of the soleus at 90 days old. (Control diet + saline, n = 8), NF (control diet + fluoxetine, n = 8), HS (hyperlipidic / hypercaloric diet + saline n = 8) HF (hyperlipidic diet + fluoxetine, n = 8). The values were found as mean and standard error of the media. The data were analyzed by the ANOVA test in two ways, Tukey test. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF, \$ = HS vs. HF. P < 0.05.

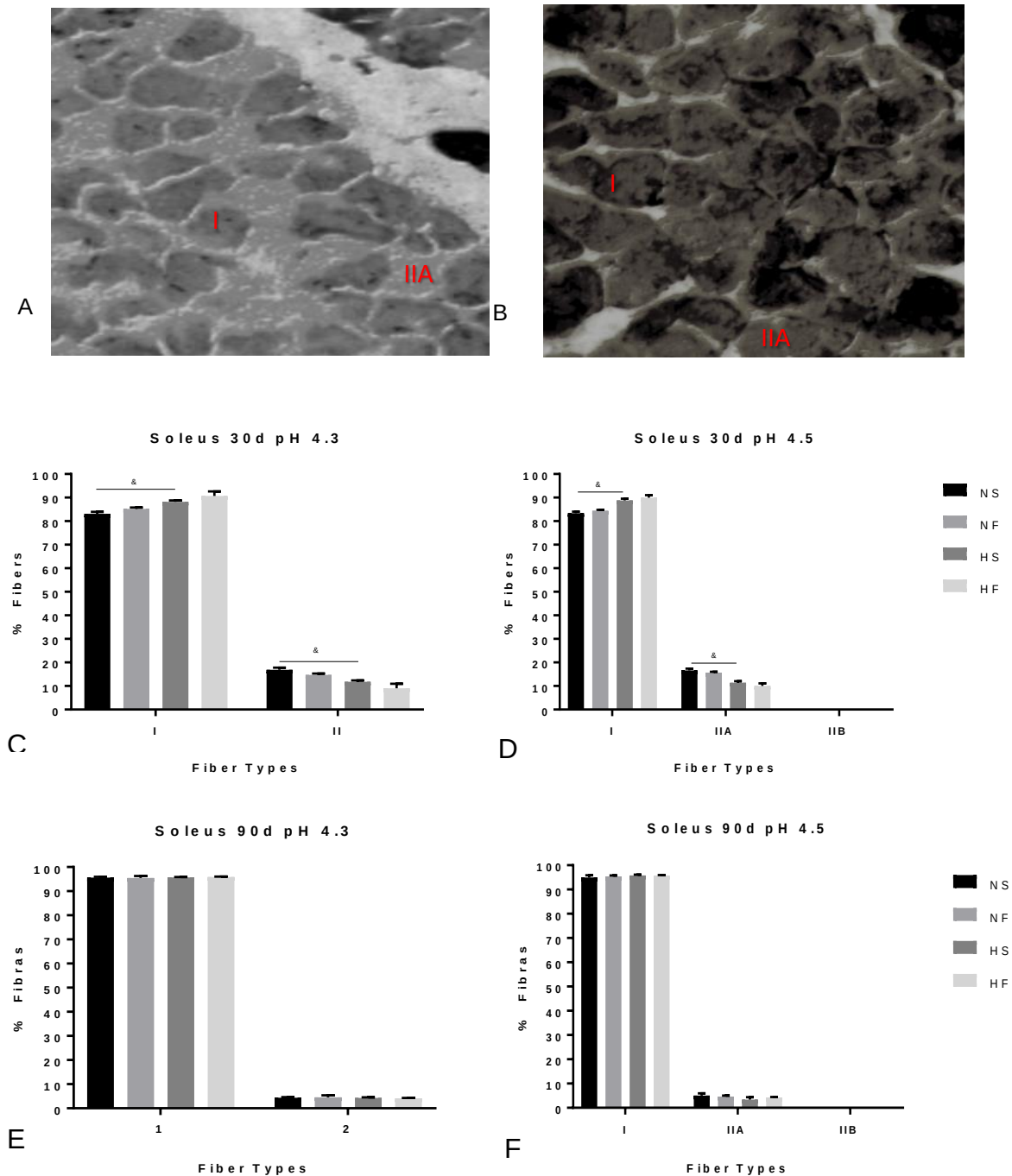


Figure 6. Proportion of muscle fibers of soleus muscle of pups at 30 and 90 days old determined by staining after preincubation at pH 4.3 and pH 4.55. A) Sample of soleus at 30 days old; B) Sample of soleus at 90 days old; C) Proportion of fibers in the soleus muscle at 30 days old pH 4.3, D) Proportion of fibers in the soleus muscle at 30 days old pH 4.5, E) Proportion of fibers in the soleus muscle at 90 days old pH 4.3, F) at 90 days pH 4.5. The composition of the groups according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment: NS (control diet + saline, n = 5), NF (control diet + fluoxetine, n = 5), HS (hyperlipidic / hypercaloric diet + n = 5 saline) HF (hyperlipidic diet + fluoxetine, n = 5). The values were presented as mean and standard error of the mean. The data were analyzed by the ANOVA two way test, followed by the Tukey test. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF, \$ = HS vs. HF, P < 0.05.

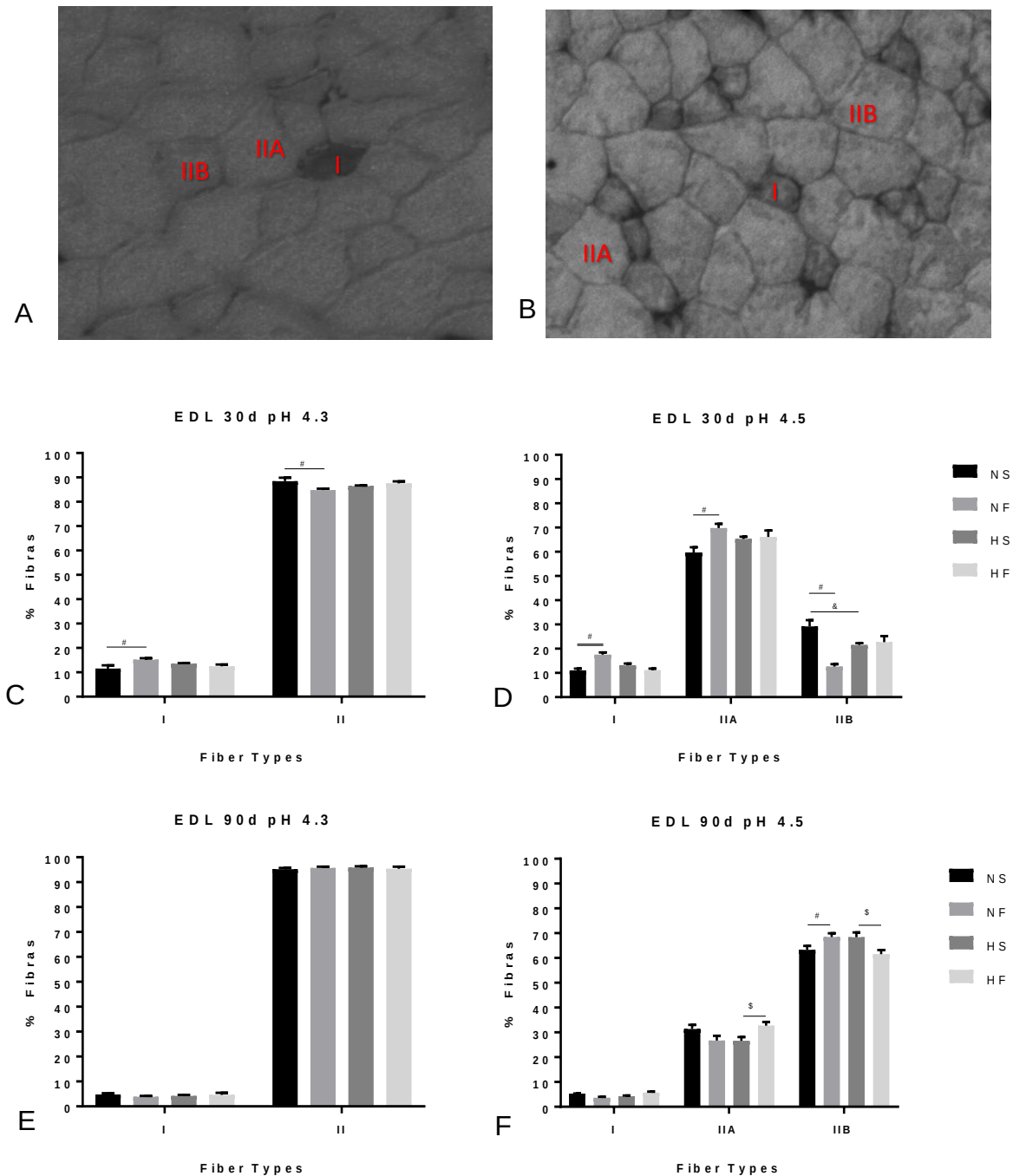


Figure 7. Proportion of muscle fibers in the EDL muscle of the pups at 30 and 90 days old determined by staining after preincubation at pH 4.3 and pH 4.55. A) Sample of EDL muscle at 30 days old; B) Sample of the EDL muscle at 90 days old; C) Proportion of fibers in the EDL muscle at 30 days old pH 4.3, D) Proportion of fibers in the EDL muscle at 30 days old pH 4.5, E) Proportion of fibers in the EDL muscle at 90 days old pH 4.3, F) at 90 days old pH 4.5. The composition of the groups according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment: NS (control diet + saline, n = 5), NF (control diet + fluoxetine, n = 5), HS (hyperlipidic / hypercaloric diet + n = 5 saline) HF (hyperlipidic diet + fluoxetine, n = 5). The values were presented as mean and standard error of the mean. The data were analyzed by the ANOVA two way test, followed by the Tukey test. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF, \$ = HS vs. HF. P < 0.05.

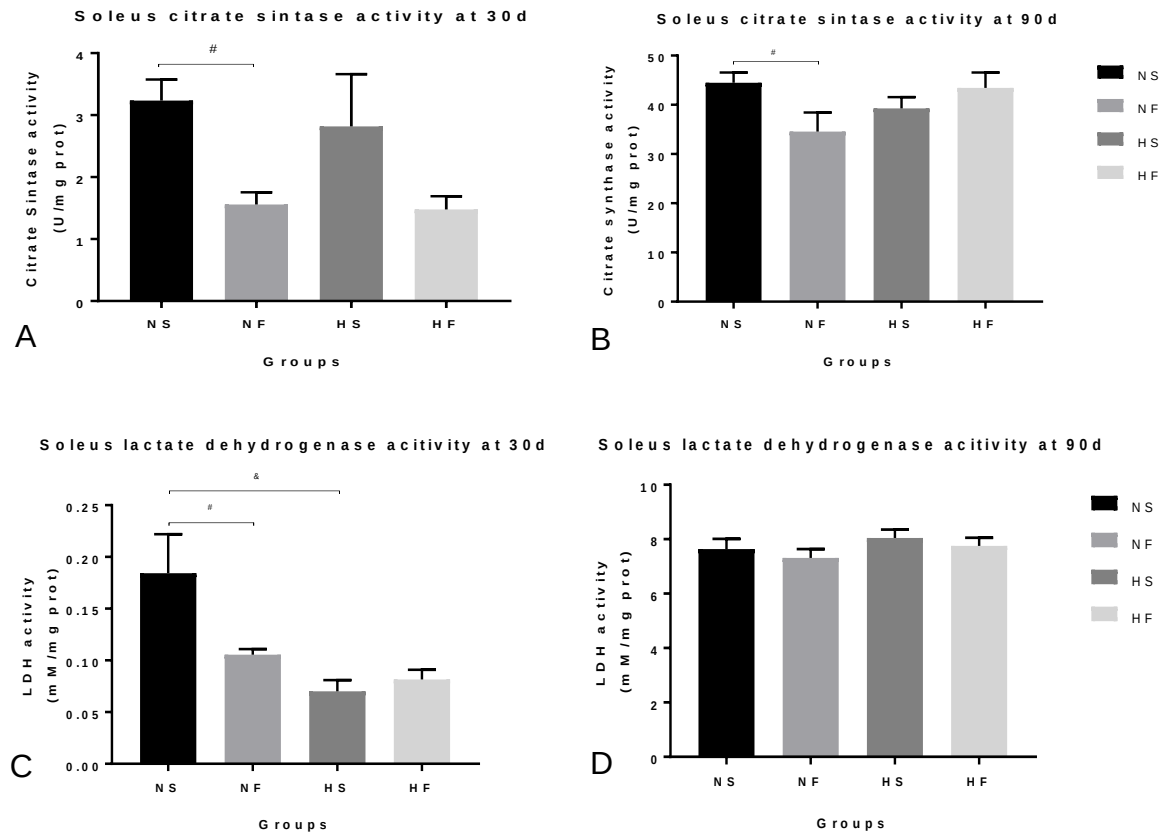


Figure 8. Enzymatic activity of citrate synthase and lactate dehydrogenase in the soleus muscle of pups at 30 and 90 days old. A) Activity of Citrate Synthase in the soleus muscle at 30 days old, B) Citrate Synthase activity in the soleus muscle at 90 days old, C) Lactate Dehydrogenase activity in the soleus muscle at 30 days old, D) Lactate dehydrogenase activity in the soleus muscle at 90 days old. The composition of the groups according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment: NS (control diet + saline), NF (control diet + fluoxetine), HS (hyperlipidic / hypercaloric diet + saline) HF (hyperlipid diet + fluoxetine). The values were presented as mean and standard error of the mean. Data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures, followed by the Tukey test. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF, \$ = HS vs. HF. $P < 0.05$.

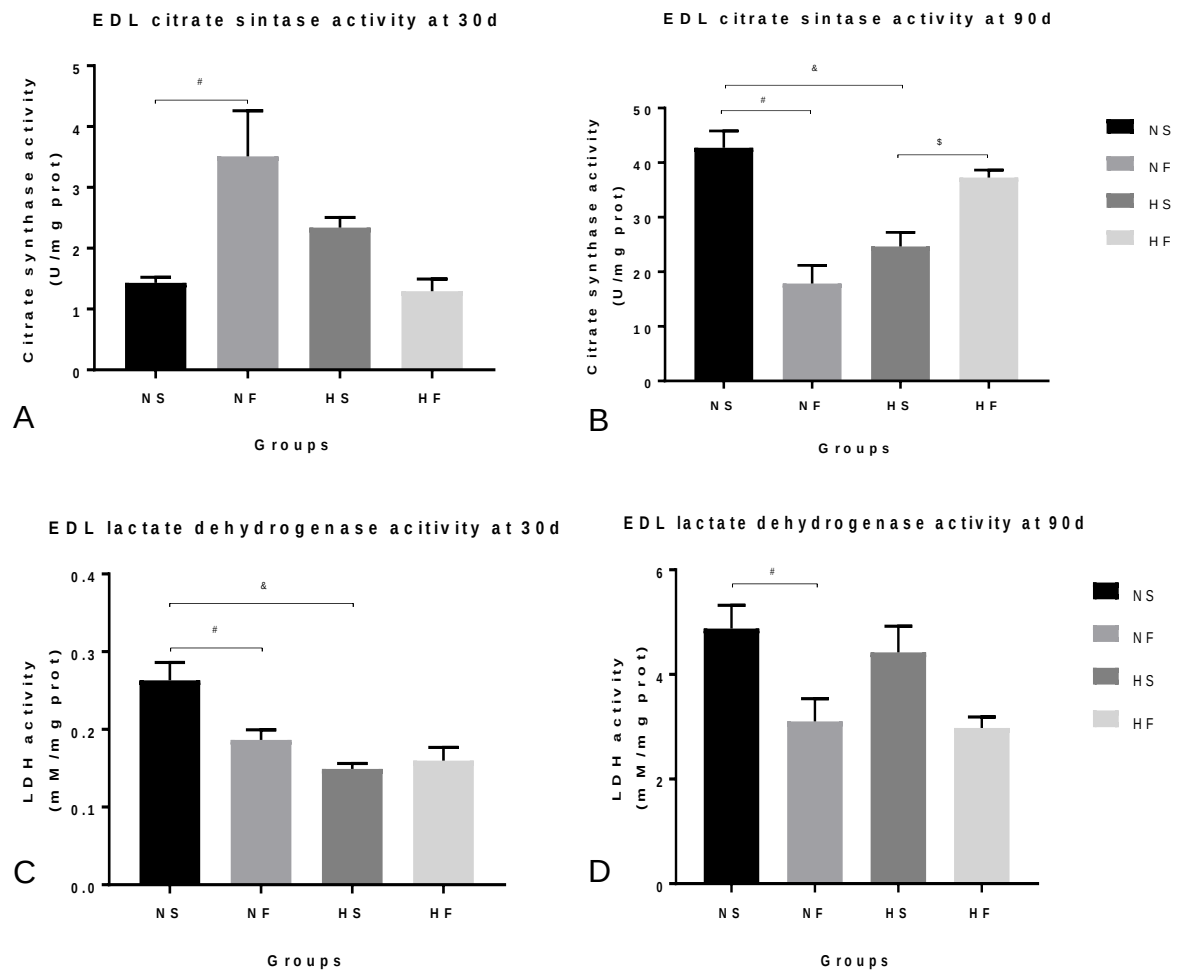


Figure 9. Enzymatic activity of citrate synthase and lactate dehydrogenase in EDL muscle of puppies at 30 and 90 days old. A) Citrate Synthase activity in the EDL muscle at 30 days old, B) Citrate Synthase activity in the EDL muscle at 90 days old, C) Lactate Dehydrogenase activity in the EDL muscle at 30 days old, D) Lactate Dehydrogenase activity in the EDL muscle at 90 days old. The composition of the groups according to exposure to maternal diet and pharmacological treatment: NS (control diet + saline), NF (control diet + fluoxetine), HS (hyperlipidic / hypercaloric diet + saline) HF (hyperlipid diet + fluoxetine). The values were presented as mean and standard error of the mean. Data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures, followed by the Tukey test. & = NS vs. HS, # = NS vs. NF, \$ = HS vs. HF. $P < 0.05$.

Anexo 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 23 de agosto de 2016.

Ofício nº 81/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0027/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Repercussões da inibição da recaptção serotoninérgica sobre a plasticidade fenotípica de músculos esqueléticos: estudo em ratos jovens e adultos submetidos ou não à dieta materna perinatal, hiperlipídica e hipercalórica**”, registrada com o nº 0027/2016, sob a responsabilidade de Prof.^a **Elizabeth do Nascimento** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	2016-2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	96
Peso/Idade	220-250g/90-120 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério de criação do Departamento de Nutrição/CCS/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584