

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**DIETAS HIPERLIPÍDICAS MATERNA: REPERCUSSÕES
SOBRE A MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA
PROLE DE RATOS**

RECIFE

2018

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**DIETAS HIPERLIPÍDICAS MATERNA: REPERCUSSÕES
SOBRE A MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA
PROLE DE RATOS**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Título de Mestre em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Prof. Dr^a. Raquel da Silva Aragão.

Co-orientador: Prof. Dr. José Antônio dos Santos.

RECIFE

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- O48d Oliveira, Thaynan Raquel dos Prazeres.
Dietas hiperlipídicas materna: repercussões sobre a morfologia do músculo esquelético da prole de ratos / Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira. – 2018.
72 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Raquel da Silva Aragão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.
- Inclui referências e anexos.
1. Dieta hiperlipídica. 2. Nutrição materna. 3. Fibra muscular. 4. Músculo esquelético. I. Aragão, Raquel da Silva (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

THAYNAN RAQUEL DOS PRAZERES OLIVEIRA

**DIETAS HIPERLIPÍDICAS MATERNA: REPERCUSSÕES SOBRE A
MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA PROLE DE RATOS**

Dissertação aprovada em 22/02/2018

Profª Drª. Gisélia de Santana Muniz
Departamento de Nutrição / UFPE

Drª. Tassia Karin Ferreira Borba
Departamento de Nutrição / UFPE

Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior
Núcleo de Biologia– CAV/UFPE

RECIFE

2018

Dedico esta dissertação aos meus queridos familiares e amigos, que me apoiaram e incentivaram durante toda essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus e nossa Senhora** por me dar forças durante essa jornada e por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, **Sileide Maria e Irapuan Ribeiro**, e minha avó **Raquel Silva** pelo apoio incondicional, força e incentivo. À minha irmã **Thayana** e as minhas queridas sobrinhas **Maysah e Lyviah**, que em diversos momentos difíceis nessa caminhada, me fizeram sorrir e me deram força para seguir em frente. E ao meu companheiro **Eric Moraes** por estar junto comigo durante toda essa trajetória, pelo apoio, e amor que faz toda a diferença em cada dia da minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim. Eu amo vocês!

À minha orientadora **Professora Raquel Aragão**, pela imensa paciência, dedicação e por todos os ensinamentos que contribuíram na minha formação acadêmica. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu acreditava não ser capaz de corresponder. Você foi e é uma referência de professora e pesquisadora pra mim. Obrigada por tudo!

Ao meu professor co-orientador **José Antônio**, que tenho profunda admiração e gratidão por todos os ensinamentos e por sempre acreditar que eu sou capaz.

Ao professor **Yves Touneur**, por todo suporte e pelos ensinamentos na microscopia, que contribuíram na execução deste trabalho.

Aos professores participantes desta banca examinadora, Prof. **Francisco Amanajás**, Prof^a. **Gisélia Santana** e Dr^a. **Tássia Karin**, obrigada por fazerem parte deste momento tão importante e por todas as contribuições que fizeram para este trabalho.

As professoras que tenho profunda admiração, Prof^a **Carol Leandro**, Prof^a **Kelly Ferraz**, Prof^a **Ana Elisa** e Prof^a **Isabeli Lins** pelos ensinamentos e conselhos.

As minhas companheiras do grupo hiperlipídicas, **Carolina Cadete**, **Erika Burbano**, **Raquel Benjamin** e **Amanda Lago** e em especial a minha amiga **Jaqueline Silva** pela ajuda direta na execução deste trabalho e por todos os momentos de alegria compartilhados. Este trabalho é nosso. Obrigada por tudo meninas!

Aos meus queridos amigos, em especial **Josiete**, **Amanda** e **Deborah**, por todo apoio, carinho e amizade.

As minhas colegas da turma de mestrado, e aos amigos que conquistei durante essa jornada (**Tássia Borba**, **Diego Lacerda** e **Jéssica Fragoso**) por toda ajuda, ensinamentos e amizade.

À coordenação e aos professores do programa de pós-graduação em nutrição, em especial a professora **Elizabeth do Nascimento** e as funcionárias **Cecília** e **Andrea**, também aos funcionários **Seu França** e **Danilo Fontes (CAV)** por toda ajuda e orientação.

*“Não é o que você faz, mas quanto amor
você dedica no que faz que realmente importa”.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A nutrição materna desempenha papel crítico no desenvolvimento fetal e pós-natal da prole. O aumento da ingestão de lipídios e calorias por alterações dietéticas nos períodos de gestação e lactação pode influenciar o desenvolvimento do fenótipo muscular. O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica materna, isocalórica ou hipercalórica, nos períodos de gestação e lactação, sobre a morfologia do músculo esquelético da prole de ratos. Foram utilizadas 34 ratas albinas da linhagem Wistar, divididas em 3 grupos experimentais: Controle (C), Hiperlipídico-Hipercalórico (HH) e o Hiperlipídico-Isocalórico (HI). Aos 61 dias de idade, os filhotes de cada grupo experimental foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) e aos 65 dias ao teste de tolerância à insulina (ITT). Aos 70 dias, os animais foram sacrificados e os músculos sóleo e EDL retirados para análise histológica. Os animais do grupo HH apresentaram aumento do peso corporal e do percentual de ganho de peso na lactação em relação ao grupo C. Nos filhotes HI, foi observado menor peso corporal e eixo longitudinal aos 21 dias pós-natal e maior percentual de ganho de peso que os animais C. Não foram observadas diferenças nas respostas glicêmicas aos testes de GTT e ITT. No músculo sóleo, os filhotes HH apresentaram aumento da proporção e tamanho das fibras tipo 1 e redução da proporção e do número com aumento do tamanho das fibras tipo 2A, todos em relação ao filhotes C. Nos filhotes HI, foi observado aumento do tamanho das fibras tipo 1 e 2A em relação aos filhotes C. No músculo EDL, não houve diferença na proporção e no número de fibras entre os grupos. Em relação ao tamanho das fibras, os animais HH e HI apresentaram redução do tamanho das fibras tipo 1 e 2A em relação ao C. Quando avaliadas as fibras tipo 2B, foi observado que o grupo HH apresentou maior tamanho que os grupos C e HI, também no EDL. Os animais do grupo HI também apresentaram menor tamanho que o grupo C para as fibras 2B. Em conclusão, o consumo materno da dieta hiperlipídica-hipercalórica promoveu perfil mais oxidativo, no músculo sóleo. Enquanto que a dieta hiperlipídica-isocalórica apenas influenciou o tamanho das fibras. No músculo, EDL ambas as dietas afetaram o tamanho da fibra muscular.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Nutrição materna. Fibra muscular. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Maternal nutrition plays a critical role in the fetal and postnatal development of offspring. Increased lipid and calorie intake due to dietary changes in the gestation and lactation periods may influence the development of the muscle phenotype. The objective of this study was to evaluate the effects of high-fat diets maternal, isocaloric or high-caloric, during the gestation and lactation periods, on the morphology of the skeletal muscle of the offspring of rats. Thirty-four female Wistar rats were used, divided into three experimental groups: Control (C), High-fat/high-caloric (HH) and High-fat/Isocaloric (HI). At 61 days of age, pups from each experimental group were submitted to the glucose tolerance test (GTT) and at 65 days to the insulin tolerance test (ITT). At 70 days, the animals were sacrificed and the soleus and EDL muscles were removed for histological analysis. The animals of the HH group showed an increase in body weight and percentage of weight gain in lactation in relation to group C. In HI pups was observed lower body weight and longitudinal axis at 21 postnatal days and higher percentage of weight gain than animals C. No differences were observed in the glycemic responses to the GTT and ITT tests. In the soleus muscle, the HH pups showed an increase in the proportion and size of the type 1 fibers and reduction of the proportion and the number with increase of the size of the fibers type 2A, all with respect to the pups C. In the pups HI, an increase of the size of the type 1 and 2A fibers was observed in relation to the pups C. In the EDL muscle, there was no difference in the proportion and number of fibers between the groups. In relation to the size of the fibers, the HH and HI animals showed a reduction in the size of the fibers type 1 and 2A in relation to the C. When the type 2B fibers were evaluated, it was observed that the HH group presented larger size than the groups C and HI. The animals of the HI group also presented smaller size than the group C for the 2B fibers. In conclusion, maternal consumption of the High-fat/high-caloric diet promoted a more oxidative profile, in the soleus muscle. While a High-fat/Isocaloric diet only influenced the size of the fibers. In muscle, EDL both as diets affected the size of the muscle fiber.

Key words: High-fat diet. Maternal nutrition. Muscle fibers. Skeletal muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema dos estágios iniciais do desenvolvimento do músculo esquelético	17
Figura 2 -	Esquema da linhagem de desenvolvimento do músculo esquelético	18
Figura 3 -	Esquema de formação dos grupos experimentais	32
Figura 4 -	Crescimento somático da prole	38
Figura 5 -	Resposta glicêmica aos testes de tolerância à glicose e à insulina	39
Figura 6 -	Imagens dos cortes transversais do músculo sóleo (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,3.	41
Figura 7 -	Imagens dos cortes transversais do músculo sóleo (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,55.	42
Figura 8 -	Imagens dos cortes transversais do músculo EDL (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,3.	45
Figura 9 -	Imagens dos cortes transversais do músculo EDL (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,55.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição centesimal das dietas experimentais	31
Tabela 2 -	Parâmetros ponderais e nutricionais maternos durante a gestação e lactação.	37
Tabela 3 -	Parâmetros corporais e musculares ao sacrifício	40
Tabela 4 -	Parâmetros morfométricos do músculo sóleo	44
Tabela 5 -	Parâmetros morfométricos do músculo EDL	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bhlh	<i>Basic helix-loop-helix</i>
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase I
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDL	Extensor longo dos dedos
GLUT4	Transportador de glicose
GPR39	Receptor acoplado à proteína G 39
GTT	Teste de tolerância à glicose
HH	Grupo Hiperlipídico-Hiperclórico
HI	Grupo Hiperlipídico-Isocalórico
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
MHC	Cadeia de miosina pesada
MRFs	Fatores de regulação miogênica
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina
P13K	1 fosfatidilinositol 3-quinases
PGC-1α	Coativador 1-alfa do Receptor gama Ativado por Proliferador de peroxima
PPARδ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma delta
T3	Hormônio da tireoide triiodotironina
TRα	Receptor nuclear do hormônio da tireoide alfa
TRβ	Receptor nuclear do hormônio da tireoide beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Plasticidade Fenotípica	14
2.2 Desenvolvimento do Sistema Muscular esquelético	15
2.3 Plasticidade fenotípica no Sistema Muscular Esquelético por estímulo de dietas experimentais	22
3 HIPÓTESE.....	27
4 OBJETIVO	28
4.1 Geral	28
4.2 Específicos	28
5 METÓDOS.....	29
5.1 Questões éticas	29
5.2 Animais	29
5.3 Manipulação dietética	30
5.4 Desenho Experimental	30
5.5 Avaliações das mães	32
5.5.1 Avaliação do peso corporal.....	32
5.5.2 Consumo alimentar.....	32
5.6 Avaliação dos filhotes.....	33
5.6.1 Avaliações Somáticas.....	33
5.6.2 Teste de tolerância à glicose e à insulina.....	33
5.6.3 Coleta de amostras.....	34
5.7 Análise histológica.....	34
5.8 Análises estatísticas	35
6 RESULTADOS	36
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÃO.....	59
8.1 PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	72

1 INTRODUÇÃO

Nos períodos iniciais da vida, como gestação e lactação, os órgãos e tecidos apresentam uma rápida proliferação e diferenciação celular (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002). Tais períodos são conceituados como período crítico de desenvolvimento (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002). Estímulos ambientais como nutrição, atividade física e estresse, atuam nos processos de plasticidade alterando o desenvolvimento do organismo (GLUCKMAN, HANSON e SPENCER, 2005). A plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um único genótipo dar origem a diversos fenótipos em respostas a diferentes condições ambientais (WEST-EBERHARD, 1989).

A nutrição é um fator ambiental que permite ao organismo adequado crescimento e desenvolvimento (MORGANE *et al.*, 1993). O consumo de dieta rica em caloria e lipídio durante o período gestacional tem sido crescente (ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005), além disso, o aporte nutricional inadequado na gestação pode acarretar riscos para saúde materna e da prole (OSTLUND, HAGLUND e HANSON, 2004; ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005). Diversos estudos em humanos e animais têm sugerido que o aumento na ingestão materna pode desencadear no feto o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares na vida adulta (ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005; CHECHI e CHEEMA, 2006; SAMUELSSON *et al.*, 2008).

Dentre os sistemas que podem ser influenciados pela nutrição materna, destaca-se a musculatura esquelética, que devido sua alta plasticidade se adapta às variações do estado nutricional (ZHU *et al.*, 2006; MALLINSON *et al.*, 2007). Esta adaptação pode ser observada através de mudanças no fenótipo muscular, em termos de tipo, tamanho e número da fibra muscular, através de alterações na expressão gênica e nas propriedades bioquímicas e metabólicas (MATSAKAS e PATEL, 2009; BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013).

Estudos têm demonstrado que o aumento no consumo de lipídios e alta ingestão calórica nos períodos de gestação e lactação podem comprometer o desenvolvimento funcional e estrutural do músculo esquelético (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; BARROS *et al.*, 2006; BAYOL, BRUCE e WADLEY, 2014). Bayol e colaboradores (2005) observaram os efeitos da dieta de cafeteria, rica em ácidos graxo saturados e sacarose no período de gestação e lactação na prole de ratos aos 21 dias de idade, e verificaram redução da área de secção transversa, do número de fibras musculares por secção e aumento do conteúdo de lipídio intramuscular no músculo semitendinoso.

Por outro lado, diferenças no tipo de fibra têm sido amplamente associadas com obesidade e resistência à insulina. Indivíduos obesos apresentam redução da quantidade de fibras do tipo 1 (oxidativas) concomitantemente com o aumento de fibras do tipo 2B (glicolítica) (NYHOLM *et al.*, 1997; TANNER *et al.*, 2002b). Em estudo com mulheres obesas afro-americanas e caucasianas, foi observado aumento do percentual de fibras do tipo 2B e uma redução no percentual das fibras do tipo 1 no músculo reto abdominal (TANNER *et al.*, 2002b). Em ratos, a dieta hiperlipídica materna (45% lipídio) reduziu a expressão de mRNA da cadeia de miosina pesada (MHC) da isoforma do tipo 1, sem nenhuma diferença na MHC tipo 2A no músculo sóleo da prole na idade adulta (PILEGGI *et al.*, 2016a).

Apesar dos estudos utilizando a dieta hiperlipídica durante o período perinatal (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; KRUSE *et al.*, 2013; PANTALEAO *et al.*, 2013; MACPHERSON *et al.*, 2015; STANFORD *et al.*, 2015), ainda não está claro se as repercussões são consequência do aumento do lipídio da dieta ou do aporte energético. Desta forma, este trabalho buscou responder o seguinte questionamento: pode a dieta hiperlipídica materna, independente do teor calórico alterar o número e tamanho das fibras musculares e aumentar o conteúdo de lipídio intramuscular nos músculos sóleo e EDL da prole?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plasticidade fenotípica

Os períodos iniciais de crescimento e desenvolvimento são marcados por uma rápida proliferação e diferenciação celular de órgãos e tecidos (DOBBING, 1964; MORGANE *et al.*, 1993). Tais períodos são conceituados como períodos críticos do desenvolvimento (MORGANE *et al.*, 1993). Os períodos críticos estão relacionados com uma maior vulnerabilidade fisiológica, bioquímica, morfológica e comportamental relacionado com alguns insultos ambientais (MORGANE *et al.*, 1993). Um insulto ou estímulo ambiental aplicados no período crítico de desenvolvimento, como nutrição, atividade física e estresse, pode levar a alterações no desenvolvimento do organismo (GLUCKMAN, HANSON e SPENCER, 2005).

A plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um único genótipo dar origem a diversos fenótipos do organismo em resposta a diferentes condições ambientais (WEST-EBERHARD, 1989). Assim, a plasticidade no período crítico permite que o organismo modifique sua trajetória de crescimento e desenvolvimento através de processos adaptativos, podendo ser alterado sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (WEST-EBERHARD, 1989).

A nutrição é uma das variações mais bem descritas no estudo da plasticidade fenotípica. Alterações na disponibilidade de nutrientes, ou do tipo de nutriente durante períodos críticos parecem atuar modificando o desenvolvimento de sistemas fisiológicos (WEST-EBERHARD, 1989). O aporte inadequado de nutrientes no período fetal e na infância está relacionado a doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo II na vida adulta (BARKER, 2007). Em estudos em humanos, filhos de mulheres que foram expostas a grande restrição alimentar durante a gestação entre os anos de 1944-1945 (*Dutch famine*), foi observado diferentes padrões de composição corporal na vida adulta, dependendo da idade que foram expostos a desnutrição na vida intrauterina, tendo uma maior incidência de obesidade, os homens cuja as mães sofreram desnutrição no primeiro trimestre gestacional (RAVELLI, STEIN e SUSSER, 1976).

Insultos ambientais adversos na vida uterina ou durante a infância estão diretamente associadas com o aumento da susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta (BARKER, 2007). A hipótese do fenótipo poupador ou “*thrifty phenotype hypothesis*” é uma das justificativas para esta relação (HALES e BARKER, 1992). Segundo a hipótese, o organismo em desenvolvimento se adapta às condições de baixo aporte nutricional, causando

modificações no metabolismo para maior capacidade de estocagem de energia, assim como melhor aproveitamento energético (HALES e BARKER, 1992). Porém diante do aumento do aporte nutricional no período pós-natal, o organismo apresenta alterações metabólicas que podem levar ao aparecimento de doenças (HALES e BARKER, 1992). A relação entre o ambiente perinatal e o aparecimento de doenças na vida adulta, tem sido alvo de diversos estudos inseridos na “Origem desenvolvimentista da Saúde e da doença” (BARKER, 2007; WELLS, 2010).

Os mecanismos envolvidos nesses fenômenos da plasticidade fenotípica têm sido chamados de epigenética (AGUILERA *et al.*, 2010; WELLS, 2010). A epigenética é definida como mudanças na atividade e expressão do gene, sendo resultado de modificações estruturais transitórias ou estáveis no DNA, histonas e também modificações pós-transcricionais no RNA sem alteração na sequência do DNA (SHARPLES, STEWART e SEABORNE, 2016). Os mecanismos epigenéticos incluem: metilação do DNA, modificações covalentes nas histonas e RNA não codificados, que são relacionados com a regulação da expressão gênica e estrutura da cromatina (BIRD, 2002; FEINBERG, 2007).

A nutrição é um fator ambiental capaz de induzir alterações epigenéticas que podem ser transmitidas para as próximas gerações, tendo impacto sobre a saúde (TOKUNAGA *et al.*, 2013). As alterações epigenéticas que ocorrem durante o período embrionário têm maior impacto sobre organismo do que a fase adulta, devido suas consecutivas divisões mitóticas (AGUILERA *et al.*, 2010).

2.2 Desenvolvimento do Sistema Muscular esquelético

Na maior parte dos mamíferos, o músculo esquelético corresponde a cerca de 55% da massa total do corpo e desempenha um papel vital na locomoção, produção de calor e metabolismo energético (ZIERATH e HAWLEY, 2004). Estruturalmente o tecido muscular esquelético é organizado de forma hierárquica, por diversos fascículos que são constituídos por um conjunto de fibras. As fibras, por sua vez são formadas por conjuntos de miofibras, e essas são compostas por inúmeros sarcômeros (ZIERATH e HAWLEY, 2004).

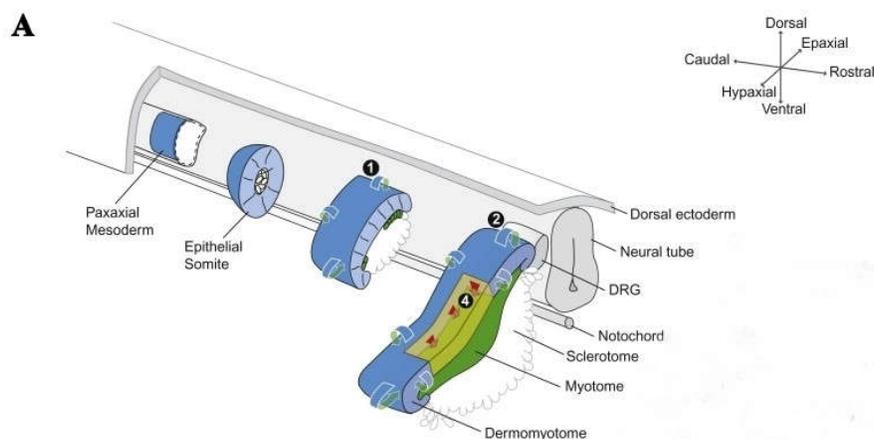
O desenvolvimento do tecido músculo esquelético é iniciado na embriogênese, onde nos estágios iniciais de desenvolvimento a principal evento da gastrulação é criação do mesoderma entre o ectoderma e endoderma (GREFTE *et al.*, 2007). O mesoderma é dividido em mesoderma axial (notocorda), mesoderma intermediário, mesoderma paraxial e mesoderma lateral. (GREFTE *et al.*, 2007). Com exceção dos músculos craniofaciais, grande

parte dos músculos esqueléticos embrionários são derivados do mesoderma paraxial (CHRIST e ORDAHL, 1995). O mesoderma paraxial se diferencia e condensa-se em estruturas epiteliais chamadas somitos (GREFTE *et al.*, 2007). A parte ventral do somito o esclerótomo origina a cartilagem, ossos da coluna vertebral e costelas, enquanto que a parte dorsal do somito o dermomiótomo origina as células progenitoras do músculo e a derme (CHRIST e ORDAHL, 1995) (Figura 1A). As bordas do dermomiótomo sofre transição epitélio-mesenquimal e origina o miótomo (TAJBAKSHSH e BUCKINGHAM, 2000).

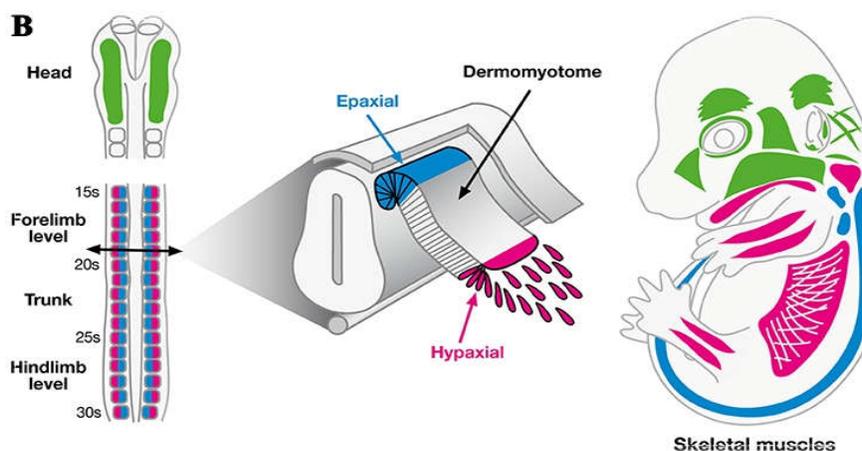
O miótomo se divide em duas porções: dorso-medial (epaxial) e ventro-lateral (hipaxial), dando origem respectivamente aos músculos eretores da coluna e aos músculos abdominais e tórax (TAJBAKSHSH e BUCKINGHAM, 2000), enquanto que as células que originam os músculos dos membros são provenientes da porção ventral do dermomiótomo que após sofrer a transformação da epitélio mesenquimal migram para o membro (BUCKINGHAM *et al.*, 2003) (Figura 1B), estes processos são regulados pelo fator de transcrição *Pax3*, membro das proteínas do homeodomínio box pareado (TAJBAKSHSH *et al.*, 1997). Em camundongos mutantes *Pax3* os músculos dos membros estão ausentes (TAJBAKSHSH *et al.*, 1997). O *Pax3* desempenha importante papel na sobrevivência do dermomiótomo ventro-lateral e na determinação do destino das células miogênicas (TAJBAKSHSH *et al.*, 1997).

Com a formação do tubo neural, os miótomos individualizam-se e suas células são alongadas dando origem aos mioblastos, onde as células miogênicas apresentam sua morfologia definida (BUCKINGHAM *et al.*, 2003). Os genes responsáveis por essa transformação são membros da família dos fatores transcricionais *basic helix-loop-helix* (bHLH) conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs): *MyoD*, *Miogenina*, *Myf5* e *Mrf4* (RUDNICKI *et al.*, 1993; KASSAR-DUCHOSSOY *et al.*, 2004). Os mioblastos aumentam a expressão de *Myf5* e *MyoD* e através da ação da miogenina e *Mrf4*, onde se fundem para formar os miotubos e maturam-se em fibras musculares multinucleadas (TAJBAKSHSH e BUCKINGHAM, 2000). Estudos experimentais com camundongos duplo *Knockout Myf5/MyoD* nenhum músculo esquelético foi formado, devido à ausência da população precursora de mioblasto (RUDNICKI *et al.*, 1993; TAJBAKSHSH, ROCANCOURT e BUCKINGHAM, 1996). Embriões deficientes em miogenina apresentam redução severa de todos os músculos, além dos embriões sobreviverem somente durante o desenvolvimento fetal, morrendo logo após ao nascimento (HASTY *et al.*, 1993).

Figura 1. Esquema dos estágios iniciais do desenvolvimento do músculo esquelético em humanos.



(A) Representação esquemática da somitogênese. O mesoderma paraxial presomítico está localizado sob ambos os lados da notocorda. O mesoderma lateral é posicionado tangencialmente ao mesoderma intermediário, que por sua vez está posicionado lateralmente ao mesoderma paraxial. O mesoderma paraxial se diferencia e se condensa em estruturas epiteliais chamadas somitos. A parte ventral do somito o esclerótomo origina a cartilagem, ossos da coluna vertebral e costelas, enquanto que a parte dorsal do somito o dermomiótomo origina as células progenitoras do músculo e a derme. As bordas do dermomiótomo sofre uma transição epitélio-mesenquimal e origina o miótomo. Adaptado de (BUCKINGHAM e MAYEUF, 2012);

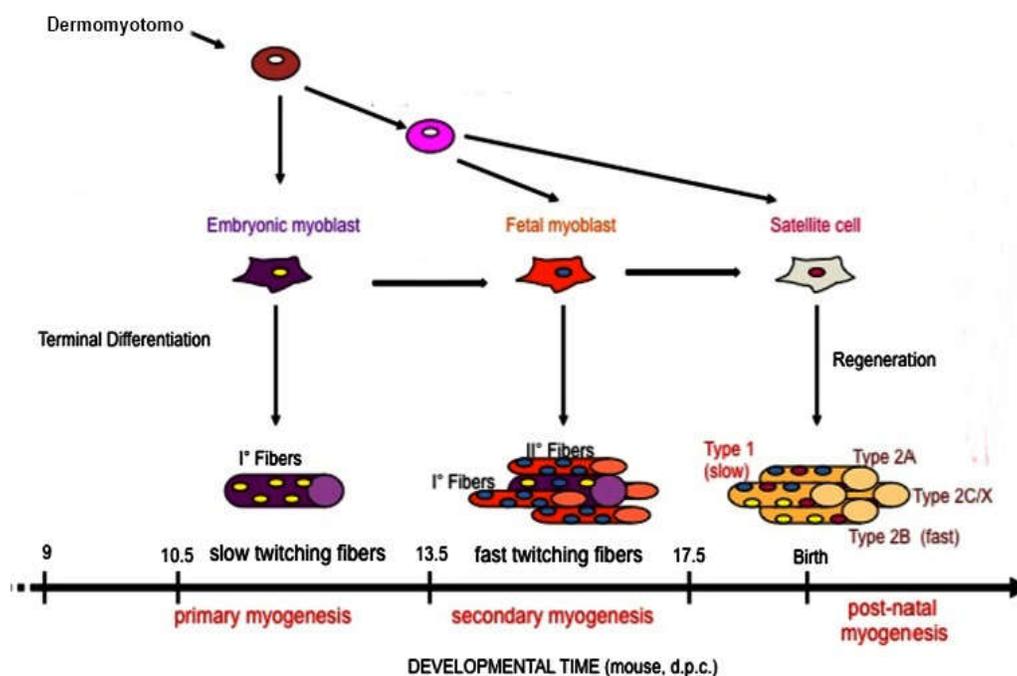


(B) Origens embrionárias dos músculos esqueléticos. As células miogênicas do músculo esquelético possui duas distintas origens embrionárias. O mesoderma paraxial (verde) origina as células miogênicas dos músculos da cabeça, exceto os músculos da língua e da parte posterior do pescoço, que são originados da porção hipaxial do dermomiótomo (rosa). A porção epaxial do dermomiótomo (azul) dá origem às células miogênicas dos músculos das costa aos músculos no tronco, enquanto que as células do diafragma e dos músculos dos membros

são originadas da porção hipaxial do dermomiótomo (rosa). Adaptado de (NASSARI, DUPREZ e FOURNIER-THIBAUT, 2017).

A formação das fibras musculares esqueléticas ocorre em duas gerações na maioria das espécies de mamíferos (CONDON *et al.*, 1990). A primeira geração origina as fibras primárias, que crescem longitudinalmente alcançando os tendões e adquirindo sua própria lâmina basal, além de atuar como suporte para as fibras secundárias (WILSON, ROSS e HARRIS, 1988) (Figura 2). Em ratos e camundongos a formação das fibras primárias ocorre em torno do 14º e 17º dia embrionário (ONTELL, BOURKE e HUGHES, 1988) e entre a 8ª e 10ª semana de gestação em humanos (BARBET, THORNELL e BUTLER-BROWNE, 1991). A segunda geração origina as fibras secundárias, e ocorre entre o 17º dia embrionário e o início do período neonatal em ratos e camundongos (WILSON, ROSS e HARRIS, 1988), e em humanos, por volta da 10ª e 18ª semana de gestação (BARBET, THORNELL e BUTLER-BROWNE, 1991).

Figura 2. Esquema da linhagem de desenvolvimento do músculo esquelético em camundongos.



Indicativo de tempo da linhagem de desenvolvimento do músculo esquelético. Mioblastos embrionários e fetais dão origem as fibras tipo 1 e tipo 2 respectivamente. O desenvolvimento pós-natal avança com ativação das

células satélites uma subpopulação de mioblastos formados nos estágios finais da miogênese, responsável também pela regeneração no tecido músculo esquelético. Adaptado de (ROSSI e MESSINA, 2014).

As fibras musculares são constituídas por unidades contráteis repetidas, os sarcômeros (LOWEY *et al.*, 1969). Cada unidade básica de contração muscular (sarcômeros) são constituídas por diversas proteínas, entre tais proteínas destacam-se os filamentos de actina e miosina (HUXLEY, 1969). A molécula de miosina é um hexâmero formado por cadeias de miosina: duas miosina de cadeia pesada e quatro de cadeias leves (LOWEY *et al.*, 1969). Por meio de técnicas histoquímicas da atividade da enzima ATPase na cadeia de miosina pesada (MHC), as fibras podem ser classificadas em tipo 1 (lenta) e tipo 2 (rápidas) (STARON *et al.*, 1999). Na maioria dos mamíferos as fibras musculares expressam quatro isoformas de MHC: uma isoforma lenta MHC-1 e três rápidas MHC-2A, MHC-2X, MHC-2B (LAFRAMBOISE *et al.*, 1990; STARON *et al.*, 1999), já em humanos a isoforma do tipo MHC-2B não é detectável, embora exista o gene correspondente *MYHC4* no genoma (SMERDU *et al.*, 1994), além disso, as fibras tipificadas como tipo 2B baseada na coloração da ATPase são de fato fibras do tipo 2X baseado na composição da MHC (SMERDU *et al.*, 1994).

A diversificação inicial do tipo de fibra reflete a heterogeneidade intrínseca da linhagem de mioblastos (SCHIAFFINO e REGGIANI, 2011). A primeira geração de fibras musculares expressam isoformas de MHC lenta, embrionária e neonatal (CONDON *et al.*, 1990), enquanto que a segunda geração expressam isoformas embrionária e neonatal (BARBET, THORNELL e BUTLER-BROWNE, 1991). As duas populações da geração primária, expressando embrionária e neonatal, embrionária e lenta originam as fibras musculares rápida e lenta respectivamente (CONDON *et al.*, 1990).

As fibras lentas apresentam essa característica mais precocemente do que as fibras que serão rápidas (KARDON, CAMPBELL e TABIN, 2002). Estudos têm evidenciado que o músculo esquelético de ratos não são completamente diferenciadas em nascimento e que a diferenciação nos subtipos das fibras musculares ocorre durante o desenvolvimento pós-natal (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004). Ho e colaboradores (1983) observaram que o músculo sóleo de ratos aos 6º dias pós-natal possui predominância de fibras do tipo 2A entretanto a relação se inverte aos 21 dias com predominância das fibras do tipo 1, que constitui cerca de 70-80% da composição do músculo na vida adulta. Enquanto que no músculo Extensor longo dos dedos (EDL), 93% de fibras do tipo 2 estão indiferenciadas na primeira semana de vida, e na vida adulta apresenta cerca de 55% de fibras 2A e 35% de fibras 2B (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004). A proporção de fibras musculares

pode apresentar um considerável grau de variabilidade para cada linhagem de rato. No músculo sóleo a proporção das fibras tipo 1 pode variar entre 87% e 100% e entre 13% e 0% do tipo 2A. Enquanto que no EDL, a proporção de fibras do tipo 1 pode variar entre 2,6 e 8,7%, do tipo 2A de 12,6 e 25,8% e do tipo 2B de 70,4 e 81,6% (NOVAK, ZACHAROVA e SOUKUP, 2010).

Um dos principais determinantes na transição das isoformas de MHC é o hormônio da tireoide triiodotironina (T3) (LEE, KIM e MILANESI, 2014). O T3 estimula a expressão de fatores de regulação miogênica, incluindo miogenina e MyoD (MUSCAT *et al.*, 1994), além de atuar na transição das isoformas de miosina neonatal para adultos (BUTLER-BROWNE, HERLICOVIEZ e WHALEN, 1984). Em ratos a falta de hormônios da tireoide resulta em uma persistente isoforma de MHC embrionária no músculo fetal em ratos (BUTLER-BROWNE, HERLICOVIEZ e WHALEN, 1984). Enquanto que o excesso de hormônios tireoidianos leva ao acúmulo de MHC, resultando em uma maturação precoce do músculo esquelético fetal em humanos (BUTLER-BROWNE, BARBET e THORNELL, 1990).

O crescimento pós-natal do músculo esquelético envolve o aumento de mionúcleos e proteínas (hipertrofia). Esse aumento se deve aos novos mionúcleos que vem de células satélites provenientes de uma subpopulação de mioblastos que são formados durante os estágios finais da miogênese (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). As células satélites estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares (ZAMMIT *et al.*, 2004). Durante o crescimento pós-natal do músculo esquelético algumas células satélites são ativadas e se proliferam doando núcleos para as miofibras contribuindo para síntese proteica e hipertrofia, outras células satélites permanecem em estado quiescente (SCHIAFFINO *et al.*, 2013) podendo ser recrutados durante o crescimento e regeneração (BRACK e RANDO, 2012). Em camundongos, sob condições fisiológicas normais, a taxa de ativação e fusão de células satélites é alta durante as três primeiras semanas de vida pós-parto (WHITE *et al.*, 2010), enquanto que em humanos o crescimento muscular pós-natal parece continuar entre 15 e 18 anos (PARTRIDGE, 2013).

A ativação das células satélites é regulada por diversos fatores de crescimento e pela expressão fatores de transcrição reguladores assim como o *paired box* Pax7 (YIN, PRICE e RUDNICKI, 2013). O Pax7 é expresso em células satélites quiescentes e em proliferação apresentando importante papel para especificação da população de células satélites (SEALE *et al.*, 2000). Em ratos a deficiência de Pax7 promove a perda progressiva de linhagens de células satélites (RELAIX *et al.*, 2006), redução do conteúdo de miofibras em cerca de 50% e do diâmetro da fibra, além dos camundongos apresentarem baixa capacidade de

sobrevivência, morrendo dentro das primeiras 3 semanas de vida (VON MALTZAHN *et al.*, 2013). Estudos sugerem que a expressão de Pax7 é um pré-requisito para função normal de células satélites durante a miogênese regenerativa em qualquer idade (SEALE *et al.*, 2000; VON MALTZAHN *et al.*, 2013).

Importante destacar ainda, que no crescimento pós-natal a hipertrofia da fibra muscular ocorre por duas vias principais: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, 1 fosfatidilinositol 3-quinases, AKT ou proteína quinase b e proteína alvo da rapamicina (IGF1-PI3K-AKT/PKB-mTOR) vias que atua como reguladores positivo do crescimento muscular. Enquanto que a via da miostatina-Smad3 atua como regulador negativo (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Em estudo com animais, a inativação do receptor do IGF-1 no músculo esquelético prejudicou o crescimento muscular e reduziu do número e tamanho da fibra muscular (MAVALLI *et al.*, 2010).

A AKT estimula a síntese proteica por meio da ativação da mTOR (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). A mTOR ativada, interage com diversas proteínas que estão diretamente relacionadas com a síntese proteica, crescimento e divisão celular (PROUD, 2004). A inativação da mTOR no músculo esquelético de camundongos, reduziu o crescimento pós-natal, devido a redução do tamanho das fibras rápidas e apresentou miopatia severa (RISSON *et al.*, 2009).

A miostatina é expressa em células no miótomo durante o desenvolvimento do músculo esquelético, atuando para regular o número final de fibras musculares formadas (LEE, 2004). Enquanto que na vida adulta, a miostatina é produzida pelo músculo esquelético e atua para limitar o crescimento da fibra muscular (LEE, 2004). Em camundongos o aumento de miostatina circulante acarretou intensa perda da massa muscular, semelhantes ao que se observa nas síndromes de caquexia humana (ZIMMERS *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do músculo esquelético pode ainda ser influenciado por glicocorticoides, hormônios esteroides secretados pelo córtex adrenal (TE PAS, DE JONG e VERBURG, 2000; HAN, YANG e KAO, 2017). Os principais hormônios endógenos em humanos é o cortisol, enquanto que em roedores é o corticosterona (KUO, HARRIS e WANG, 2013). Os glicocorticoides atuam na redução da síntese proteica e aumento do catabolismo por inibição da insulina, IGF-1, PI3K e mTOR (PEREIRA e FREIRE DE CARVALHO, 2011). Além disso, os glicocorticoides podem aumentar a expressão de miostatina, importante regulador negativo do crescimento muscular (MA *et al.*, 2003). Por outro lado, recente estudo com cultura de células C2C12 evidenciou que o tratamento com dexametasona um glicocorticoide sintético no estágio de mioblasto induziu hipertrofia e

melhora na diferenciação de miotubos, enquanto que o mesmo tratamento no estágio de miotubo induziu a atrofia (HAN, YANG e KAO, 2017). Desta forma, parece que a biodisponibilidade de glicocorticoides no músculo pode exercer duplo efeito, sendo dependente dos estágios de desenvolvimento (HAN, YANG e KAO, 2017).

É importante ressaltar que no período de desenvolvimento do sistema muscular, os processos de formação, diferenciação e crescimento pós-natal da fibra muscular podem sofrer influência direta em resposta à diferentes condições ambientais, atuando na plasticidade muscular, alterando seu fenótipo.

2.3 Plasticidade fenotípica no Sistema Muscular Esquelético por estímulo de dietas experimentais

A massa e a composição do músculo esquelético apresentam um importante papel na locomoção e metabolismo (PILEGGI *et al.*, 2016b). O músculo possui o maior reservatório de proteína no corpo, podendo atuar na manutenção da glicemia do sangue em períodos de jejum prolongado através da liberação de aminoácidos (HARRIDGE, 2007). É considerado o maior captador de glicose pós-prandial (DEFRONZO *et al.*, 1981), responsável por cerca de 70-80% da captação de glicose estimulada por insulina de todo corpo (DEFRONZO *et al.*, 1981). Durante o metabolismo basal e atividades de intensidade leve e moderada, o músculo é um grande consumidor de ácido graxo (ABERNETHY, THAYER e TAYLOR, 1990), contribuindo com cerca de 40% da taxa metabólica basal em adultos (MATSAKAS e PATEL, 2009).

As fibras musculares apresentam diferenças metabólicas: fibras tipo 1 oxidativas, tipo 2A oxidativas-glicolíticas e tipo 2B glicolítica (SCHIAFFINO, HANZLIKOVA e PIEROBON, 1970). As fibras oxidativas utilizam os ácidos graxos como fonte de energia (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013) e apresentam um maior estoque de triglicerídeos intramuscular do que as fibras do tipo 2 (ABERNETHY, THAYER e TAYLOR, 1990). As fibras do tipo 1 possuem maior capacidade de captação de glicose (BASS *et al.*, 1969), além de uma maior eficiência na remoção da glicose do sangue (PATTI *et al.*, 2003).

O músculo esquelético é um tecido altamente plástico que responde aos desafios ambientais e fisiológicos, alterando seu fenótipo, em termos de tipo de fibra, tamanho, número e morfologia, através de alterações na expressão gênica e nas propriedades bioquímicas e metabólicas (MATSAKAS e PATEL, 2009; BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). O período crítico de desenvolvimento do músculo esquelético, parece

envolver tanto o período de gestação quanto o período de lactação (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Estes períodos apresentam uma maior vulnerabilidade fisiológica, bioquímica e morfológica relacionado com alguns insultos ambientais, como a nutrição materna (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Alterações de algumas características do músculo esquelético que ocorrem durante a vida fetal, podem afetar diretamente o metabolismo do músculo esquelético na vida adulta (BOYLE, 2011).

Estudos têm evidenciado a influência negativa sobre o metabolismo muscular da prole exposta a insultos nutricionais. A prole de ratas que foram submetidas à dieta hipoproteica (7,8% proteína) no período de gestação e lactação apresentou diminuição na taxa de oxidação de ácidos graxos, redução da atividade da enzima hexoquinase e da taxa de glicólise no músculo sóleo rico em fibras do tipo 1 (DA SILVA ARAGAO *et al.*, 2014). A restrição de dieta em cordeiros (50%) no início do período gestacional promoveu, diminuição do transportador GLUT4 e atividade da enzima carnitina palmitoil transferase I (ZHU *et al.*, 2006). Enquanto que a dieta hiperlipídica materna (34% lipídio), reduziu os níveis de GLUT4 no músculo sóleo da prole ao desmame, apresentando uma falha no transporte de glicose que poderia ser associado com a resistência à insulina na vida adulta (SIMAR *et al.*, 2012).

O aumento da disponibilidade de ácido graxo para células musculares pode ocorrer através de ingestão de dietas ricas em lipídios, infusão de lipídios e jejum prolongado (SILVEIRA *et al.*, 2008). O excesso de lipídios no músculo esquelético pode levar a lipotoxicidade, além de perturbações na utilização de glicose (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). Por outro lado a capacidade do músculo esquelético em modificar o substrato de oxidação em resposta a mudanças na disponibilidade de nutrientes é uma indicação de tecidos metabolicamente saudável (GALGANI, MORO e RAVUSSIN, 2008).

Atualmente tem sido bastante utilizada em modelos animais o uso de dietas ocidentalizadas ou dieta de cafeteria, caracterizadas por ser altamente processada, palatável, hipercalórica, com a maioria carboidratos simples, e hiperlipídica, com grande quantidade de gorduras saturadas, além de possuir baixo teor de proteínas, fibras alimentares e nutrientes essenciais (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007;). Este modelo reflete a modificação do padrão alimentar nas sociedades humanas, e busca estudar os efeitos do consumo da dieta sobre o metabolismo e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Em estudos com ratos a dieta hiperlipídica materna (45%lipídio) promoveu redução de fatores de transcrição mitocondrial *NRF1* e *mtTFA* e a supressão de alguns genes da cadeia transportadora de elétrons, do complexo I e III (*NDUFB8* e *UQCRC2*) no músculo sóleo da

prole adulta, sugerindo uma disfunção mitocondrial (PILEGGI *et al.*, 2016a). Em outro estudo utilizando camundongos C57BL/6J foi demonstrado que a dieta obesogênica materna, reduziu a expressão de receptor de insulina IRS-1 e a atividade do complexo mitocondrial II e III no músculo sóleo da prole aos 3 meses de idade, contribuindo para hiperinsulinemia e prejuízo da função mitocondrial (SHELLEY *et al.*, 2009).

Em situações de excesso de nutrientes, em particular de lipídios, o tecido adiposo não pode estocar todos os lipídios, fazendo com que os lipídios sejam redirecionados para outros tecidos como coração, fígado e músculo esquelético (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). O aumento do conteúdo de lipídio intramuscular tem sido observado em insultos nutricionais como a restrição calórica e dieta rica em ácidos graxo saturados e sacarose, aplicados no período de gestação (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; ZHU *et al.*, 2006). O acúmulo de lipídios intramuscular pode comprometer a sensibilidade a insulina no músculo, sendo considerado um marcador de resistência à insulina em todo corpo (HEGARTY *et al.*, 2003).

Interessantemente o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) é um regulador da adipogênese, altamente expresso em adipócitos (RIEUSSET *et al.*, 1999) e está envolvido na diferenciação do adipócito, estocagem de lipídios e homeostase de glicose (LEE, OLSON e EVANS, 2003). No músculo o PPAR γ regula o metabolismo de lipídio (LAPSYS *et al.*, 2000). Em estudo com ratos, a dieta de cafeteria materna, aumentou o lipídio intramuscular acompanhado do aumento dos níveis de mRNA de PPAR γ no músculo semitendinoso da prole ao desmame, sugerindo uma possível adaptação para manter a sensibilidade de insulina normal (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005).

O tamanho da fibra muscular é regulado pelo desenvolvimento e varia de acordo com o músculo (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). O mesmo tipo de fibra pode apresentar diferentes tamanhos em músculos diferentes. A fibra aumenta seu tamanho durante o desenvolvimento perinatal e pós-natal e depende de sinalização hormonal, neuronal e condições ambientais (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). Na vida adulta o tamanho da fibra muscular pode ainda ser modificada, aumentando (hipertrofia) ou diminuindo (atrofia) por vários fatores, representando a plasticidade do músculo esquelético (FRONTERA, ZAYAS e RODRIGUEZ, 2012). Baseado no balanço entre a síntese e degradação proteica, a atrofia muscular é causada pela redução da síntese proteica e um aumento da proteólise (FRONTERA, ZAYAS e RODRIGUEZ, 2012).

Tem sido demonstrado que o consumo de dieta de cafeteria, e dieta hiperlipídica materna durante o período perinatal, promove atrofia muscular com menor número de fibras

musculares (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; SAMUELSSON *et al.*, 2008; PANTALEAO *et al.*, 2013). Pileggi e colaboradores (2016) observaram que a exposição de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, elevou as concentrações de citocinas pró-inflamatória IL-6 e IL-1 β na prole. Além disso, estudos epidemiológicos têm relatado uma forte associação entre o aumento da expressão genes IL-6 e IL-1 β e redução da massa muscular e força (FERRUCCI *et al.*, 2002; SCHULZE *et al.*, 2003). É sabido que o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias de sinalização envolvidas com a resposta inflamatória apresentam um importante papel no início do catabolismo proteico (GOODMAN, 1994).

As isoformas de MHC são marcadores moleculares do tipo de fibra muscular (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004), assim a transição do tipo de fibra pode ser detectada pela avaliação da variação na expressão de miosina (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). A alteração do tipo de fibra muscular pode ser induzida por influências hormonais, carga, atividade neural (BLAAUW, SCHIAFFINO e REGGIANI, 2013). Além disso, alteração na ingestão de proteínas e de energia seja no período de maior vulnerabilidade do sistema muscular ou não, pode alterar o fenótipo muscular, podendo esta alteração ser de caráter permanente (PRESCOD, HALLIDAY e TAYLOR, 2011).

É especulado que cerca de 45% da proporção do tipo de fibra muscular é hereditário, baseado em fatores intrínsecos, enquanto que 40% seria explicado por fatores ambientais (SIMONEAU e BOUCHARD, 1995). Diferenças específicas no tipo de fibra têm sido amplamente associadas com obesidade e resistência à insulina (TANNER *et al.*, 2002b; PATTI *et al.*, 2003). Estudos com humanos têm evidenciado que indivíduos obesos apresentam uma redução da quantidade de fibras do tipo 1 (oxidativas) concomitantemente com o aumento de fibras do tipo 2B (glicolítica) (NYHOLM *et al.*, 1997; TANNER *et al.*, 2002b). Também, foi observada uma relação positiva da redução da taxa de IMC e o percentual relativo de fibras musculares do tipo 1 em indivíduos envolvidos em programa de intervenção para perda de peso (TANNER *et al.*, 2002a).

Em camundongos C57BL/6J, foi observado que o consumo de dieta hiperlipídica e hipercalórica (60% lipídio/5,24Kcal/g), durante 12 semanas, aumentou a proporção de fibras do tipo 2X e reduziu a proporção das fibras do tipo 2B no músculo EDL (ESHIMA *et al.*, 2017). Em outro estudo, utilizando porcos Ossabaw miniatura, utilizando dieta rica em lipídios, colesterol e frutose durante 24 semana, foi observado redução da expressão da MHC tipo 1 no músculo plantar e tendência de aumento do número de fibras do tipo 2B e 2X nos músculos sóleo, bíceps e plantar (CLARK *et al.*, 2011). Em contraste com esses resultados,

outro estudo com camundongos C57BL/6J observou que 8 semanas de exposição a dieta hiperlipídica (61% lipídios) aumentou a área de secção transversa das fibras do tipo 1 e reduziu a proporção de fibras do tipo 2B (SHORTREED *et al.*, 2009). Por outro lado, quando a dieta hiperlipídica (45% lipídio), foi administrada durante a gestação e lactação, reduziu a expressão de mRNA de MHC da isoforma do tipo 1, sem nenhuma diferença na MHC tipo 2A no músculo sóleo da prole na idade adulta (PILEGGI *et al.*, 2016a).

Como descrito anteriormente, os fatores de regulação miogênica MyoD, Miogenina, *Myf5* e *Mrf4* (RUDNICKI *et al.*, 1993; KASSAR-DUCHOSSOY *et al.*, 2004) são importantes no desenvolvimento e diferenciação do tecido muscular esquelético (TAJBAKHSH e BUCKINGHAM, 2000). Diversos estudos têm investigado os efeitos da dieta materna sobre os fatores de regulação miogênica (TONG *et al.*, 2009; SIMAR *et al.*, 2012). Em ovelhas, o consumo de uma dieta obesogênica durante a gestação, foi capaz de promover redução na expressão de MyoD e miogenina no músculo semitendinoso da prole, acompanhado de menor diâmetro das fibras musculares primárias, indicando uma baixa regulação da miogênese (TONG *et al.*, 2009). Em ratos, a dieta hiperlipídica materna também reduziu os níveis de MyoD e miogenina, e essa redução foi associada com aumento do massa muscular e peso corporal no músculo da prole ao desmame (SIMAR *et al.*, 2012).

A dieta hiperlipídica materna durante a gestação e lactação pode influenciar a prole tanto pelo teor de lipídios, quanto pela caloria da dieta materna, no entanto após a revisão não fica claro qual desses aspectos irá repercutir sobre plasticidade fenotípica músculo esquelética. Nesse sentido faz se necessário a realização de estudos buscando avaliar esses efeitos.

3 HIPÓTESE

A dieta hiperlipídica materna, independente do teor calórico, nos períodos de gestação e lactação reduz o número e proporção das fibras tipo 1, aumenta fibras do tipo 2 nos músculo sóleo e EDL e promove diminuição na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina na prole.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica materna, isocalórica ou hipercalórica, nos períodos de gestação e lactação, sobre a morfologia do músculo esquelético da prole de ratos.

4.2 Específico

Avaliar nas mães:

- Consumo alimentar;
- Evolução do peso corporal.

Avaliar nos filhotes:

- Crescimento somático;
- Resposta a testes de tolerância à glicose e à insulina;
- Morfometria e tipologia dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos.

5 MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida em colaboração com os laboratórios da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE): Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) e Laboratório de Nutrição Atividade Física e Plasticidade Fenotípica UFPE – Campos vitória de Santo Antônio.

5.1 Questões éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 23076.024643/2015-55 (ANEXO 1). Os experimentos foram iniciados e realizados seguindo as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), visando garantir o cuidado e manejo ético dos animais utilizados na experimentação.

5.2 Animais

Foram utilizadas 34 ratas albinas da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Foram adotados alguns critérios para escolha das ratas: não possuíram parentesco familiar, com idade entre 90 e 120 dias, peso entre 220 e 250 gramas e nulíparas. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo 12/12h [ciclo claro (20:00 às 08:00 h) e ciclo escuro (08:00 às 20:00 h)] e livre acesso à água e alimentação. Todas as manipulações foram realizadas durante o ciclo escuro. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de uma semana. Após este período os animais foram colocados em gaiola padrão de biotério feita de polipropileno (33x40x17cm). Para o monitoramento do ciclo estral das ratas foi realizado o esfregaço vaginal, e no período estro as fêmeas foram colocadas para acasalar na proporção duas fêmeas para cada macho. Para detecção do estado de prenhez, foi realizado o esfregaço vaginal e na visualização da presença de espermatozoides na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002). Após a confirmação da gestação as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas, e passaram a ter livre acesso à água e a dietas experimentais, originando três grupos: Grupo Controle (C), Grupo Hiperlipídico-Isocalórico (HI) e o Hiperlipídico-Hiper calórico (HH).

Um dia após o nascimento, os neonatos foram separados das respectivas mães para serem pesados e selecionados. Cada ninhada foi ajustada para oito filhotes (com o máximo de filhotes machos possíveis, sendo utilizadas as fêmeas apenas para completar a ninhada). Foram selecionados os machos com peso entre 4,5 e 8,0 g. Durante os primeiros 21 dias pós-natal os animais foram amamentados e também submetidos às dietas experimentais. A partir do 22º dia pós-natal os animais foram desmamados e os filhotes machos foram mantidos em gaiolas conjuntas (2-3 animais por gaiola) de forma que os animais passaram a receber a dieta padrão de biotério (Presence® Brasil) até o fim do experimento. Para as avaliações, os animais foram escolhidos de forma a evitar que irmãos estejam nos mesmos subgrupos.

5.3 Manipulação Dietética

Foram utilizadas a dieta Controle AIN-93G (% valor energético total (VET):19% de proteína, 17% de lipídios, 63% carboidratos; 3,6Kcal/g) (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) e duas dietas experimentais com diferenças na quantidade de lipídio e calorias: dieta hiperlipídica-isocalórica (%VET: 19% de proteína, 51% de lipídios, 30% de carboidratos;3,64 kcal/g), dieta hipercalórica-hiperlipídica (%VET: 19% de proteína, 51% de lipídios, 30% de carboidratos; 4,62 kcal/g), durante os períodos de gestação e lactação(CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). Essas dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) da UFPE. Na tabela 1, encontra-se a composição centesimal, o total de energia e a contribuição percentual dos macronutrientes em relação ao valor energético total das dietas ofertadas durante o período de gestação e lactação.

5.4 Desenho Experimental

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, de acordo com a dieta recebida pela mãe durante o período de gestação e lactação, formando três grupos experimentais com o seguinte n máximo de filhotes: Grupo Controle (C, n=14), Grupo Hiperlipídico-Hipercalórico (HH, n=11) Grupo Hiperlipídico-Isocalórico (HI, n=9) e (Figura 2). As dietas sempre foram ofertadas *ad libitum*. O número de filhotes utilizados, variou de entre as análises, e o n para cada dado está descrito na legenda dos resultados.

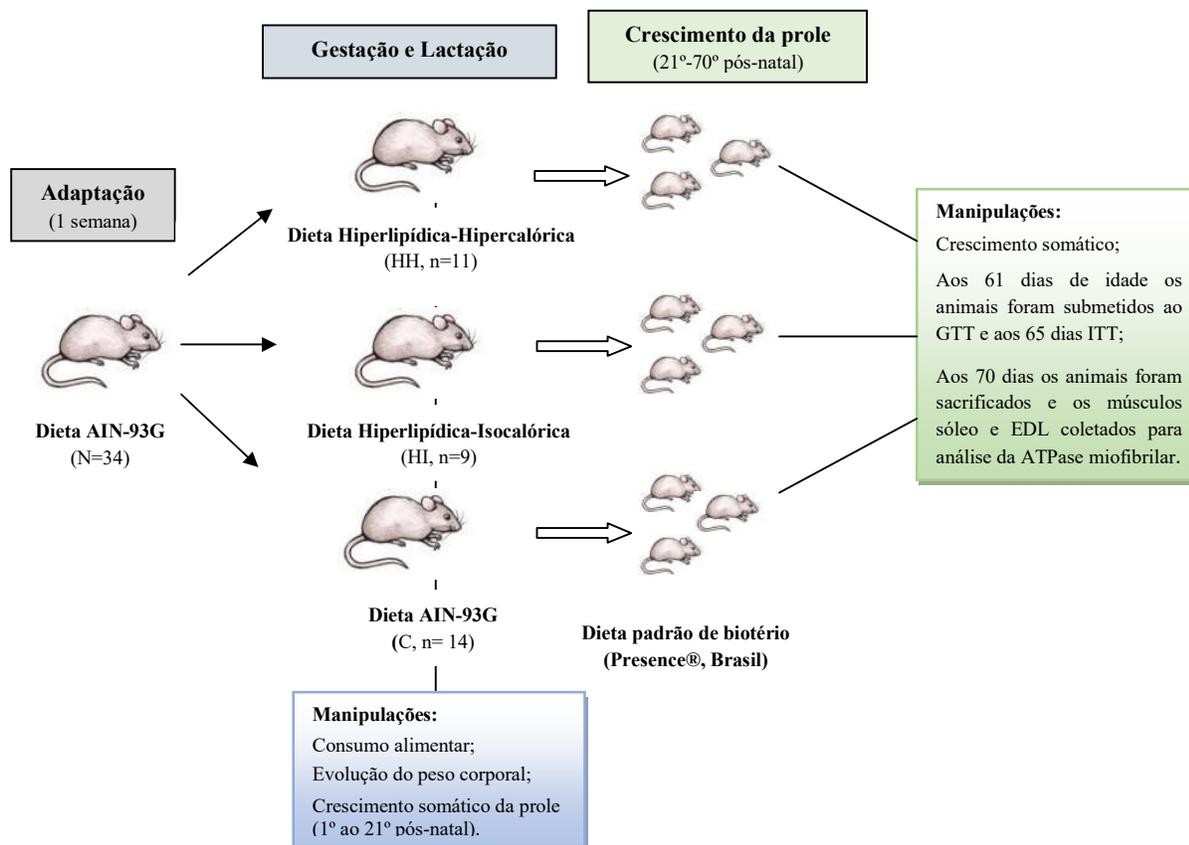
Tabela 1. Composição centesimal e valor energético das dietas experimentais

Ingredientes	Controle AIN-93G (g/100g)*	Hiperlipídica Isocalórica (g/100g)§	Hiperlipídica Hipercalórica (g/100g)§
Caseína (>85% proteína)	20,00	20,00	25,20
Amido de milho (87% carboidrato)	39,75	19,30	24,50
Amido dextrinizado (92% carboidrato)	13,20	6,40	8,00
Sacarose	10,00	4,85	6,17
Óleo de soja	7,00	7,00	7,00
Banha animal (100% lipídio)	-	13,40	19,00
Celulose	5,00	24,00	5,00
Mix mineral (AIN-93G)	3,50	3,50	3,50
Mix vitamínico	3,50	1,00	3,50
L-Metionina	1,00	1,00	1,00
Bitartarato de colina	0,30	0,30	0,38
TBHQ	0,25	0,25	0,25
Calorias (g/100g)	0,0014	0,0014	0,0014
VET por Macronutrientes			
VET (kcal/g)	3,60	3,64	4,62
Proteína (% kcal VET)	19	19	19
Carboidrato (% kcal VET)	63	30	30
Lipídio (% kcal VET)	18	51	51

*(REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993),

§ (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017)

Figura 3. Esquema de formação dos grupos experimentais.



5.5 Avaliação das mães

5.5.1 Avaliação do peso corporal

O peso corporal das mães foi avaliado no dia da detecção de prenhez e ao 20º dia de gestação, e no 1º e 21º da lactação. O peso foi aferido utilizando balança eletrônica (Shimadzu, modelo BL3200H com sensibilidade de 0,01 g). Para avaliação do percentual do ganho de peso corporal foi utilizado a fórmula: $\%GP = \frac{[\text{peso do dia}(\text{g}) \times 100 / \text{Peso do 1º dia}(\text{g})] - 100}{100}$ (BAYOLet al., 2004). Todas as avaliações foram realizadas entre 8:00 às 10:00 horas.

5.5.2 Consumo alimentar

A oferta da dieta foi realizada diariamente e consumo dietético avaliado semanalmente durante os períodos de gestação e lactação. O consumo foi determinado pela diferença entre a

quantidade de dieta ofertada e a dieta rejeitada (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008). O consumo energético semanal foi calculado pela multiplicação da quantidade de dieta ingerida durante a gestação e lactação pelo valor energético de cada dieta experimental.

5.6 Avaliação dos filhotes

5.6.1 Avaliações Somáticas

O peso corporal dos filhotes foi avaliado no 1º, 7º, 15º e 21º dia após o nascimento. Após o desmame o peso corporal foi avaliado aos 70 dias de idade (balança eletrônica digital Marte®, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,1g). Para o cálculo do índice de Lee e do índice de massa corporal (IMC) foi avaliado o comprimento naso-anal. O índice de Lee foi calculado pela fórmula: raiz cúbica do peso corporal (g) / eixo longitudinal do corpo (cm). Valores acima de 0,3 predizem obesidade (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). O IMC foi calculado pela fórmula: peso corporal (g)/comprimento nasoanal² (cm²) (NOVELLI *et al.*, 2007). Para o percentual de ganho de peso foi utilizado a fórmula: %GP=[peso do dia(g)x100/Peso do 1º dia (g)]-100 (BAYOLE *et al.*, 2004). Todas as avaliações foram realizadas entre 8:00 às 10:00 horas.

5.6.2 Teste de tolerância à glicose e à insulina

Aos 61 dias de idade, dois animais de cada ninhada foram aleatoriamente escolhidos e submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) e, aos 65 dias de idade, ao teste de tolerância à insulina (ITT). Em ambos os testes, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. Nos dois testes, foram coletados uma amostra de sangue inicial (T0) através de corte na extremidade da cauda do animal para determinação da concentração de glicose sanguínea. Para o GTT foi injetada uma solução de glicose à 50% (1mg/g de peso corporal), para o ITT foi administrado uma dose de insulina com 0,75mU/g de peso corporal, ambos via intraperitoneal (FIDALGO *et al.*, 2013). Foram coletadas novas amostras de sangue aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após as administrações. As análises foram feitas imediatamente com o glicosímetro Accu-check Performa®. Com valores de glicemias obtidos nos testes, foi calculado a área sob a curva do GTT e o cálculo da constante de decaimento da glicose (K_{itt}) do ITT (LUNDBAEK, 1962; FLOCH *et al.*, 1990).

5.6.3 Coleta de Amostras

Aos 70 dias pós-natal, os animais foram sacrificados por decapitação e os músculos sóleo (predominantemente oxidativo, rico em fibras do tipo 1) e o extensor longo dos dedos (EDL) (predominantemente glicolítico, rico em fibras do tipo 2) foram retirados por meio de uma incisão na face lateral das patas posteriores e seccionados nos tendões. Os músculos foram imediatamente pesados e congelados no n-hexano resfriado em gelo seco e posteriormente transferidos para o freezer a -80°C até análise da ATPase miofibrilar.

5.7 Análise histológica

Para a mATPase, os músculos sóleo e EDL foram fixados em suporte com utilização do *Tissuetek*® e mantidos a -20°C . Para obtenção das secções transversas de $10\mu\text{m}$ de espessura para as análises foi utilizado o criostato (LEICA modelo CM1100, Nussloch - Alemanha). Os cortes foram fixados em lâminas e ao atingirem temperatura ambiente foi iniciada a coloração.

Os cortes transversais dos músculos fixados em lâminas foram corados pela técnica da miosina miofibrilar adenosina trifosfatase cálcio ativada (mATPase), que permite a distinção entre fibras rápidas (tipo 2A e 2B) e lentas (tipo 1), através de pré-incubação em dois diferentes níveis de pH (4,3 e 4,55), com subsequente incubação em pH alcalino (9,4) (BROOKE e KAISER, 1970).

Os cortes foram pré-incubados em temperatura ambiente por 20 minutos em solução de contendo 0,2M ácido acético e 0,2M acetato de com Ph ajustado para 4,3 ou 4,55. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas a 37°C em uma solução com pH ajustado para 9,4 contendo ATP durante 45 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução de cloreto de cobalto a 2% durante 3 minutos e reveladas em solução de sulfeto de amônio 5% durante 1 minuto. Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água destilada e desidratadas em concentrações crescente de álcoois (70 a 100%), por fim as lâminas foram imersas duas vezes no tolueno. Após a secagem as lâminas foram montadas utilizando New Entellan® (BROOKE e KAISER, 1970). As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação da ATPase, onde a pré-incubação em meio ácido pH 4,3 permitiu diferenciar as fibras

lentas tipo 1 (escuras) e rápidas tipo 2 (claras), e os dois subtipos das fibras rápidas, tipo 2A (claras) e tipo 2B (coloração intermediária), no pH 4,55 (BROOKE e KAISER, 1970).

Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 10X) acoplado a um programa para captação de imagens (TV TUNER APPLICATION – Tel Signal Company Limited, Taiwan). Para o processamento das imagens obtidas, foi utilizado o software Image J (versão 1.51p). Para análise do número total e percentual do tipo de fibra muscular: pH 4,3 (fibras tipo 1 e 2), pH4,55 (fibras tipo 1, 2A e 2B) todas as fibras foram contadas em cada corte histológico, aproximadamente 1200 fibras por animal. Para a análise do número de fibras por mm², a área total tecido também foi mensurada. Para análise da área de secção transversa (µm²) e do perímetro (µm) da fibra foram calculadas: no músculo sóleo, todas as fibras tipos 2A e 2B e 500 fibras tipo 1, enquanto que no EDL, foram medidas todas as fibras tipo 1 e 500 fibras tipo 2A e 2B, por animal no pH 4,55.

5.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente foi utilizado o teste de D'Agostino-Pearson para determinar se os dados apresentam uma distribuição normal.

O consumo alimentar, peso corporal e percentual ganho de peso corporal materno e o peso corporal, percentual de ganho de peso, área sob a curva do GTT, e análises do percentual do tipo de fibra e número de fibra por mm² dos músculos sóleo e EDL dos filhotes foram analisados por ANOVA one-way (dieta) com pós-teste de Tukey.

Os dados de acompanhamento do peso corporal, eixo longitudinal, GTT e ITT foram analisados por ANOVA two-way medidas repetidas (dieta x tempo) com pós-teste de Tukey. Para análise da área e perímetro das fibras musculares, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

As variáveis paramétricas estão apresentadas em média ± erro padrão da média (EPM). As variáveis não-paramétricas estão apresentadas em mediana e percentil 25 e 75. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Parâmetros maternos durante a gestação e lactação

No período de gestação, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais com relação ao peso corporal inicial e final e percentual de ganho de peso total (Tabela 2). Em relação ao consumo alimentar total, foi observado um menor consumo nas mães do grupo HH comparado as mães dos grupos C e HI ($p < 0,0001$ vs. C; $p < 0,01$; vs. HI) (Tabela 2). Contudo, não foram observadas diferenças no consumo energético total entre os grupos experimentais (Tabela 2). Quanto ao consumo total de lipídios, os grupos HH e HI apresentaram maior consumo comparado ao grupo C ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Os grupos HH e HI apresentaram menor consumo total de carboidratos comparado ao grupo C ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Não houve diferenças entre os grupos, com relação ao consumo total de proteína (Tabela 2).

Na lactação, não houve diferenças no peso corporal inicial e final, nem no percentual de ganho de peso corporal (Tabela 2). O consumo alimentar total do grupo HH foi menor comparado aos grupos C e HI ($p < 0,0001$ vs. C; $p < 0,001$ vs. HI). Além disso, o consumo alimentar total do grupo HI foi menor comparado ao C ($p < 0,05$ vs. C) (Tabela 2). Quanto ao consumo energético total, não houve diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 2). Quanto ao consumo total de lipídio, os grupos que receberam as dietas HH e HI apresentaram maior consumo comparado ao grupo que recebeu a dieta C ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Em relação ao consumo total de carboidratos, os grupos HH e HI foi menor comparado ao grupo C ($p < 0,0001$ vs. C) (Tabela 2). Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, com relação ao consumo total de proteínas (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros ponderais e nutricionais maternos durante a gestação e lactação.

	C (n=12)	HH (n=10)	HI (n=11)
Gestação			
Peso corporal inicial (g)	246,5 ± 4,74	241,8 ± 3,96	242,2 ± 5,59
Peso corporal final (g)	339,7 ± 6,19	338,2 ± 6,54	333,5 ± 6,65
% de ganho de peso total	38,49 ± 1,61	40,05 ± 2,71	37,98 ± 2,23
Consumo alimentar total (g)	385,3 ± 13,88	284,9 ± 12,36 ****#	359,7 ± 15,87
Ingestão energética (kcal)	1387 ± 49,98	1316 ± 57,10	1309 ± 57,78
Consumo total de lipídio (g)	27,82 ± 1,00	74,88 ± 3,24 ****	74,17 ± 3,27 ****
Consumo total de carboidratos (g)	218,6 ± 7,87	99,29 ± 4,30 ****	99,03 ± 4,37 ****
Consumo total de proteína (g)	65,50 ± 2,36	61,03 ± 2,64	61,15 ± 2,69
Lactação			
Peso corporal inicial (g)	276,5 ± 4,77	264,7 ± 6,10	266,1 ± 5,87
Peso corporal final (g)	274,9 ± 5,24	266,5 ± 6,51	274,8 ± 6,68
% de ganho de peso total	0,504 ± 1,06	0,748 ± 1,60	0,176 ± 1,27
Consumo alimentar total (g)	818,4 ± 20,6	607,5 ± 15,5 ****##	740,2 ± 23,9 *
Ingestão energética (kcal)	2946 ± 74,27	2807 ± 71,89	2694 ± 87,05
Consumo total de lipídio (g)	59,0 ± 1,48	159,6 ± 4,08 ****	152,6 ± 4,93 ****
Consumo total de carboidratos (g)	464,3 ± 11,7	211,7 ± 5,42 ****	203,8 ± 6,58 ****
Consumo total de proteína (g)	136,7 ± 2,77	130,1 ± 3,33	125,8 ± 4,06

Os dados estão apresentados em média ± EPM. Dados das ratas submetidas à dieta experimental durante a gestação e lactação: C= controle, HH= Hiperlipídica-hipercalórica e HI= Hiperlipídica-isocalórica. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs. C; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. HI.

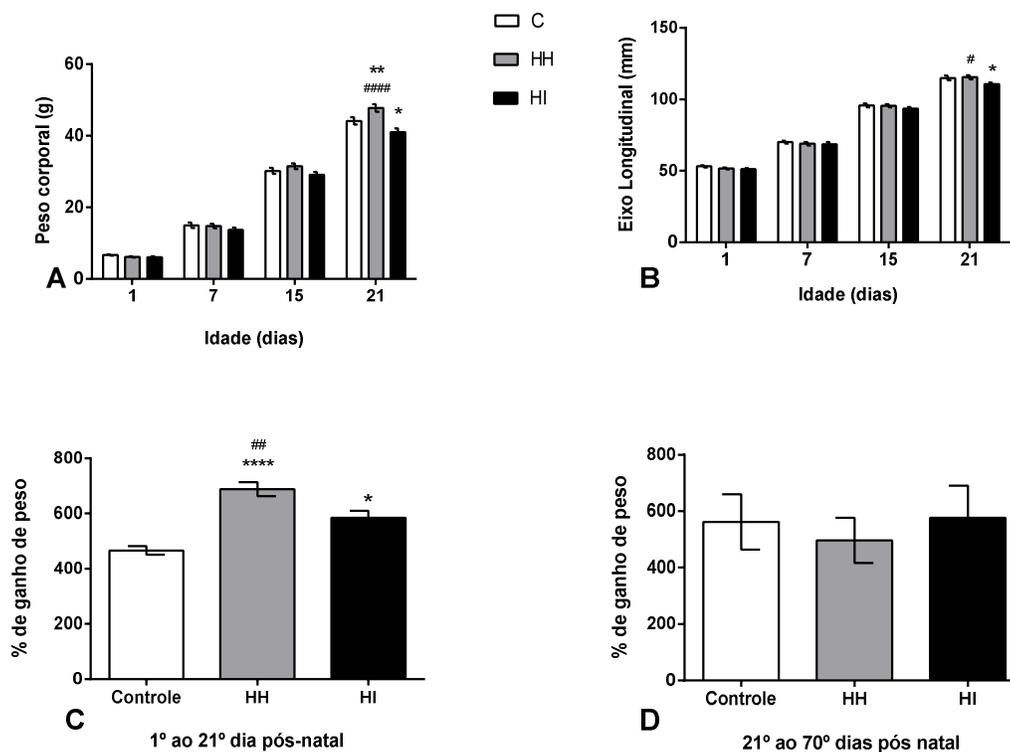
Crescimento somático da prole

Em relação ao peso corporal, houve influência dos fatores idade ($p < 0,0001$) e dieta ($p < 0,05$), e também interação entre os dois fatores ($p < 0,0001$). Aos 21 dias, o peso corporal dos filhotes do grupo HH foi maior comparado aos grupos C e HI (C: 44,18 ± 1,01; HH: 47,77 ± 1,09; HI: 41,04 ± 1,09, em gramas) ($p < 0,01$ vs. C; $p < 0,0001$ vs. C). O peso corporal dos filhotes do HI foi menor comparado ao grupo C ($p < 0,05$ vs. C) (Figura 4A). Quanto ao

eixo longitudinal, o fator idade ($p<0,0001$) influenciou a diferença entre os grupos. Os filhotes do grupo HH apresentaram maior eixo longitudinal, aos 21 dias, comparados aos filhotes do grupo HI (C: $114,93 \pm 1,61$; HH: $115,39 \pm 1,37$; HI: $110,63 \pm 1,18$, em milímetros) ($p<0,05$ vs. HI). O eixo longitudinal dos filhotes HI foi menor comparado ao grupo C ($p<0,05$ vs. C) (Figura 4B).

O percentual de ganho de peso corporal do 1º ao 21º dia foi maior nos filhotes dos grupos HH e HI quando comparado aos filhotes do grupo C (C: $466,3 \pm 15,47$; HH: $687,8 \pm 25,76$; HI: $584,8 \pm 25,81$, em %) ($p<0,0001$ HH vs. C; $p<0,01$ HI vs. C). O grupo HH apresentou maior percentual de ganho de peso corporal comparado ao grupo HI ($p<0,01$ vs. HI) (Figura 4C). Contudo, não foram observadas diferenças no percentual de peso corporal avaliado do 21º ao 70º dia pós-natal entre os grupos experimentais.

Figura 4. Crescimento somático da prole.

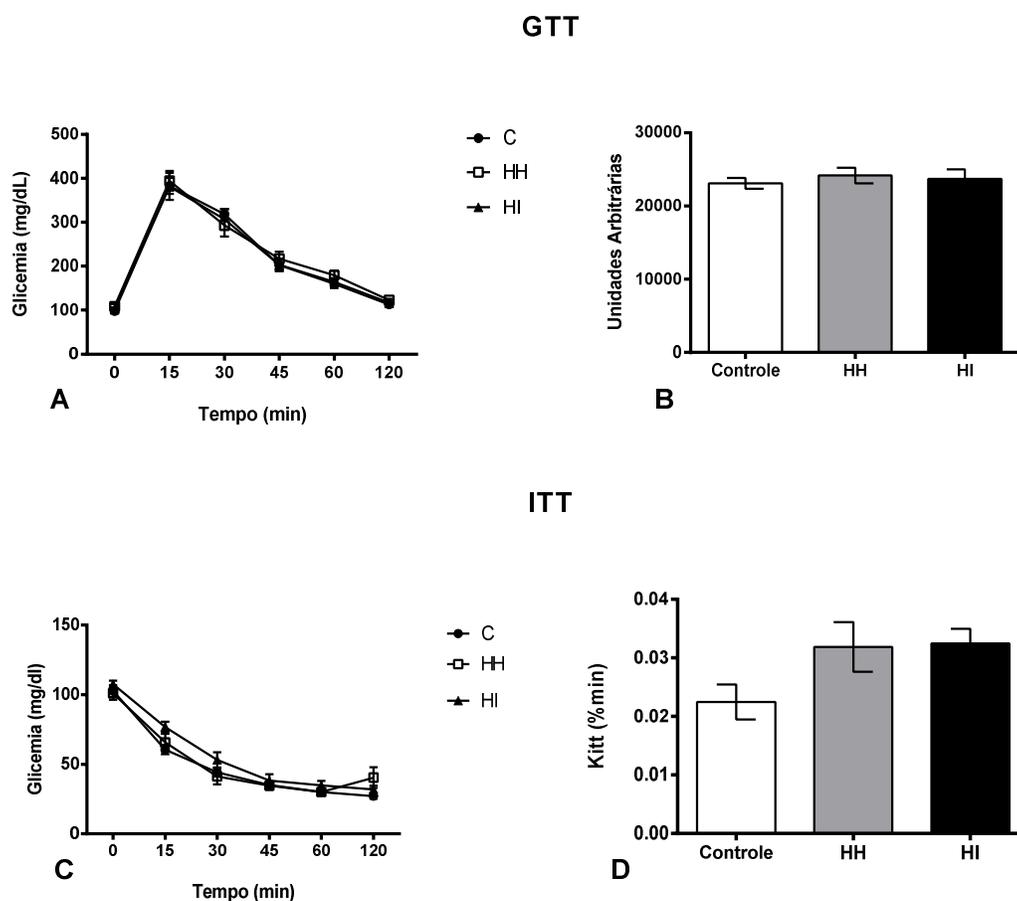


Peso corporal (A), eixo longitudinal (B), percentual do ganho de peso corporal do 1º ao 21º dia pós-natal (C), percentual do ganho de peso corporal do 21º ao 70º dia pós-natal (D) dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação: Controle (n=19); HH= Hiperlipídico-hipercalórico (n=13-15) e HI= Hiperlipídico-isocalórico (n=11). Os dados estão apresentados em média \pm EPM. Teste ANOVA two-way seguido do pós-teste Tukey; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$ vs. C; # $p<0,05$; ### $p<0,01$; ##### $p<0,0001$ vs. HI.

Testes de tolerância à glicose e à insulina

No teste de tolerância à glicose, não foram observadas diferenças na glicemia medida nos diferentes momentos (Figura 5A), nem na área sob a curva (Figura 5B) entre os grupos experimentais. Quanto ao teste de tolerância à insulina, também não foram observadas diferenças, entre os grupos experimentais, na variação da glicemia (Figura 5C), nem na constante de decaimento da glicose (Kitt) (Figura 5D).

Figura 5. Resposta glicêmica aos testes de tolerância à glicose e à insulina.



Concentrações de glicose (mg/dL) durante o teste de tolerância à glicose aos 61 dias pós desmame (A) área sob a curva do GTT (B) concentrações de glicose (mg/dL) durante o teste de tolerância à insulina aos 65 dias pós desmame (C), constante de decaimento de glicose (Kitt; %/min) (D) dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação: C= controle (n=11-13); HH= Hiperlipídico-hipercalórico (n=9-10); e HI= Hiperlipídico-isocalórico (n=10-12). Teste ANOVA one-way (B-D) e two-way (A-C) seguido do pós-teste Tukey.

Parâmetros corporais e musculares ao sacrifício

O peso corporal, eixo longitudinal e o índice de Lee aos 70 dias de idade não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 3). Quanto ao índice de massa corporal (IMC), foi observado menor valor nos animais do grupo HH comparado ao grupo HI ($p < 0,01$ vs. HH) (Tabela 3). Em relação ao peso em gramas e o peso relativo dos músculos sóleo e EDL, não houve diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros corporais e musculares ao sacrifício.

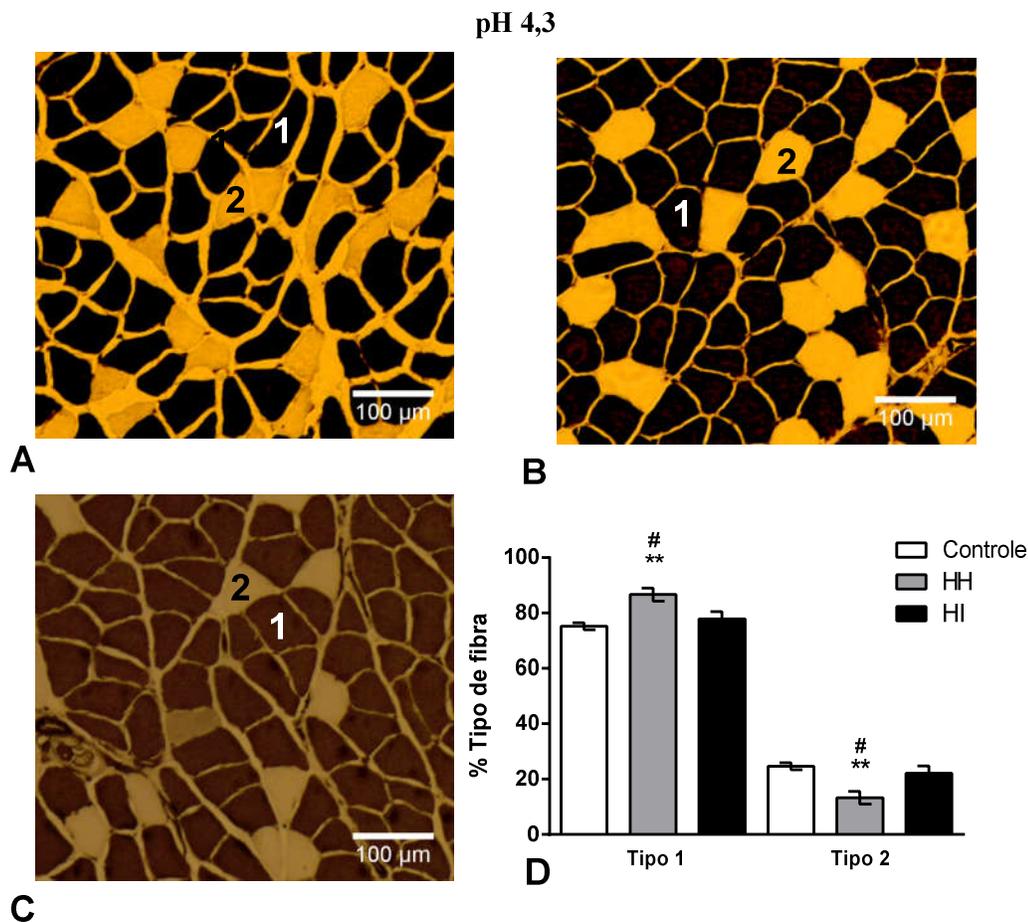
	C(n=9-19)	HH (n=7-13)	HI(n=6-10)
Peso corporal (g)	300,3 ± 8,98	284,5 ± 8,90	293,8 ± 8,66
Eixo longitudinal (cm)	22,22 ± 0,39	21,75 ± 0,33	21,28 ± 0,33
Índice de Lee (g/cm)	0,304 ± 0,002	0,297 ± 0,002	0,308 ± 0,005
Índice de massa corporal (g/cm ²)	0,602 ± 0,011	0,559 ± 0,009^{##}	0,643 ± 0,022
Peso músculo sóleo (g)	0,125 ± 0,005	0,120 ± 0,002	0,112 ± 0,005
Peso relativo músculo sóleo (%)	0,037 ± 0,002	0,038 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Peso músculo EDL (g)	0,128 ± 0,004	0,109 ± 0,006	0,114 ± 0,006
Peso relativo músculo EDL (%)	0,038 ± 0,002	0,039 ± 0,001	0,042 ± 0,001

Os dados estão apresentados em média ± EPM. Dados dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação: C= controle; HH= Hiperlipídico-hipercalórico e HI= Hiperlipídico-isocalórico. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey;^{##} $p < 0,01$ vs. HI.

Tipologia e morfometria dos músculos sóleo e EDL

No músculo sóleo, utilizando a pré-incubação em pH 4,3, os animais do grupo HH apresentaram aumento na proporção de fibras do tipo 1 (Tipo 1 C: 75,32 ± 1,24; HH: 86,72 ± 2,32; HI 77,88 ± 2,67, em %) ($p < 0,01$ vs. C; $p < 0,05$ vs. HI) e redução na proporção da fibra tipo 2 (Tipo 2 C: 24,68 ± 1,24; HH: 13,28 ± 2,32; HI: 22,12 ± 2,67, em %) ($p < 0,01$ vs. C; $p < 0,05$ vs. HI) comparado aos grupos controle e HI (Figura 6D).

Figura 6. Imagens representativas do músculo sóleo (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,3.

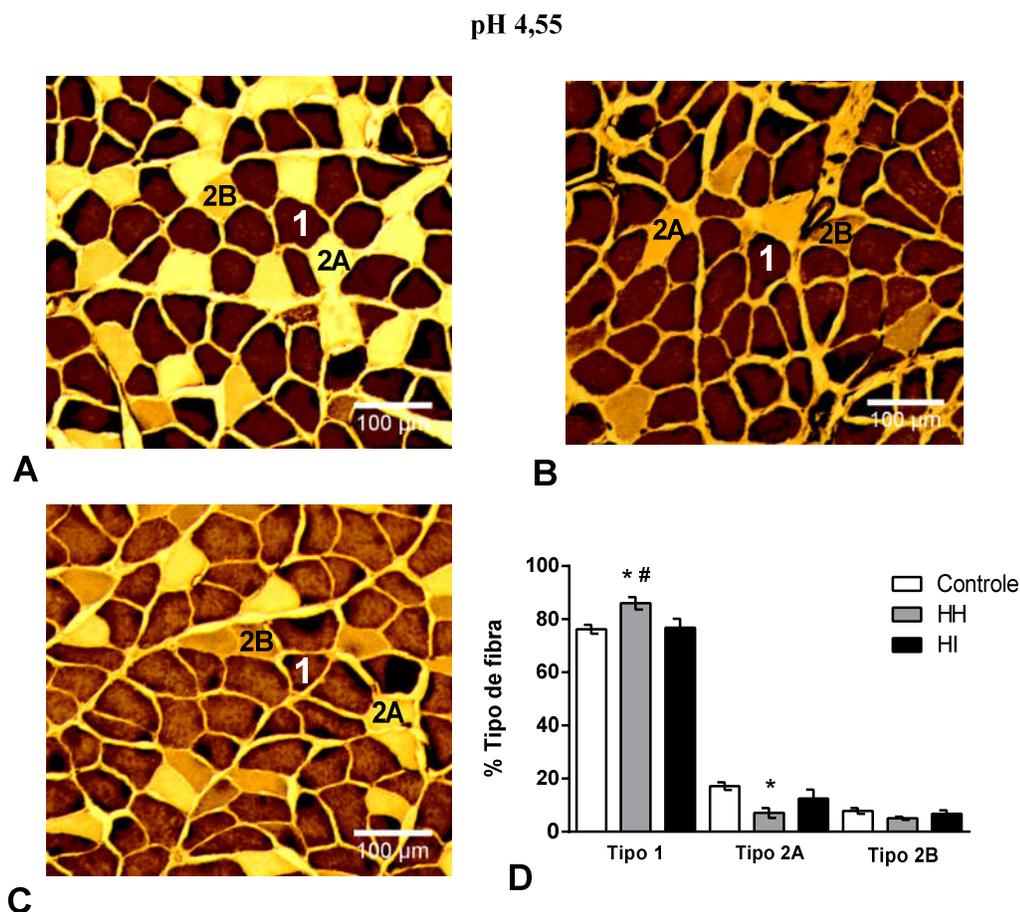


A, B, C: Cortes transversais (objetiva 10x) do músculo sóleo pré-incubados no pH 4,3 na técnica mATPase. 1: fibras do tipo 1; 2: fibras do tipo 2. (A): grupo Controle; (B): grupo Hiperlipídico-hipercalórico (HH); (C): grupo Hiperlipídico-isocalórico (HI). (D): percentual do tipo de fibra muscular no pH 4.3. Dados do músculo sóleo dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação. Os dados de (D) estão apresentados em média \pm EPM. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey; ** $P < 0,01$ vs. C; # $P < 0,05$ vs. HI.

Utilizando a pré-incubação em pH 4,55, foi possível avaliar os subtipos de fibras musculares do tipo 2 (2A e 2B). Como observado utilizando o pH 4,3, a dieta hiperlipídica-hipercalórica aumentou a proporção de fibras tipo 1 comparado aos animais do grupos controle e HI (C: $76,19 \pm 1,65$; HH: $86,07 \pm 2,32$; HI: $76,81 \pm 3,31$ em %) ($p < 0,05$ vs. C e HI) (Figura 7D). Contudo, foi observada redução na proporção de fibras tipo 2A comparado somente ao grupo controle (C: $17,20 \pm 1,45$; HH: $7,00 \pm 1,84$; HI: $12,43 \pm 3,39$ em %)

($p < 0,05$ vs. C) (Figura 7D). Não foram observadas diferenças na proporção de fibras tipo 2B entre os grupos experimentais (Figura 7D).

Figura 7. Imagens representativas do músculo sóleo (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,55.



A, B, C: Cortes transversais (objetiva 10x) do músculo sóleo pré-incubados no pH 4,55 na técnica mATPase. 1: fibras do tipo 1; 2A: fibras do tipo 2A; 2B: fibras do tipo 2B. (A): grupo Controle; (B): grupo Hiperlipídico-hipercalórico (HH); (C): grupo Hiperlipídico-isocalórico (HI). (D): percentual do tipo de fibra muscular no pH 4.3. Dados do músculo sóleo dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação. Os dados de (D) estão apresentados em média \pm EPM. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey; * $P < 0,05$ vs. C; # $P < 0,05$ vs. HI.

Continuando as avaliações no pH 4,55, com relação ao número de fibras tipo 1, não houve diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 4). Quanto ao número de fibras tipo 2A, os animais do grupo HH apresentaram menor número de fibras comparado ao grupo

controle ($p < 0,05$ vs. C) (Tabela 4). Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, quanto às fibras tipo 2B (Tabela 4).

Quanto ao perímetro das fibras, os animais do grupo HH e HI apresentaram maior perímetro das fibras tipo 1 e 2A comparados aos animais controle ($p < 0,0001$ vs. C) (Tabela 4). Quanto às fibras tipo 2B, os animais do grupo HH apresentaram maior perímetro comparado aos animais controle e HI ($p < 0,001$ vs. C; $p < 0,01$ vs. HI) (Tabela 4).

Os animais que receberam ambas as dietas hiperlipídicas apresentaram maior área de secção transversa da fibra tipo 1 e tipo 2A comparados ao filhotes de mães que receberam a dieta controle ($p < 0,0001$ vs. C) (Tabela 4). Contudo, não houve diferenças entre os grupos experimentais quanto à área de secção transversa da fibra tipo 2B (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros morfométricos do músculo sóleo.

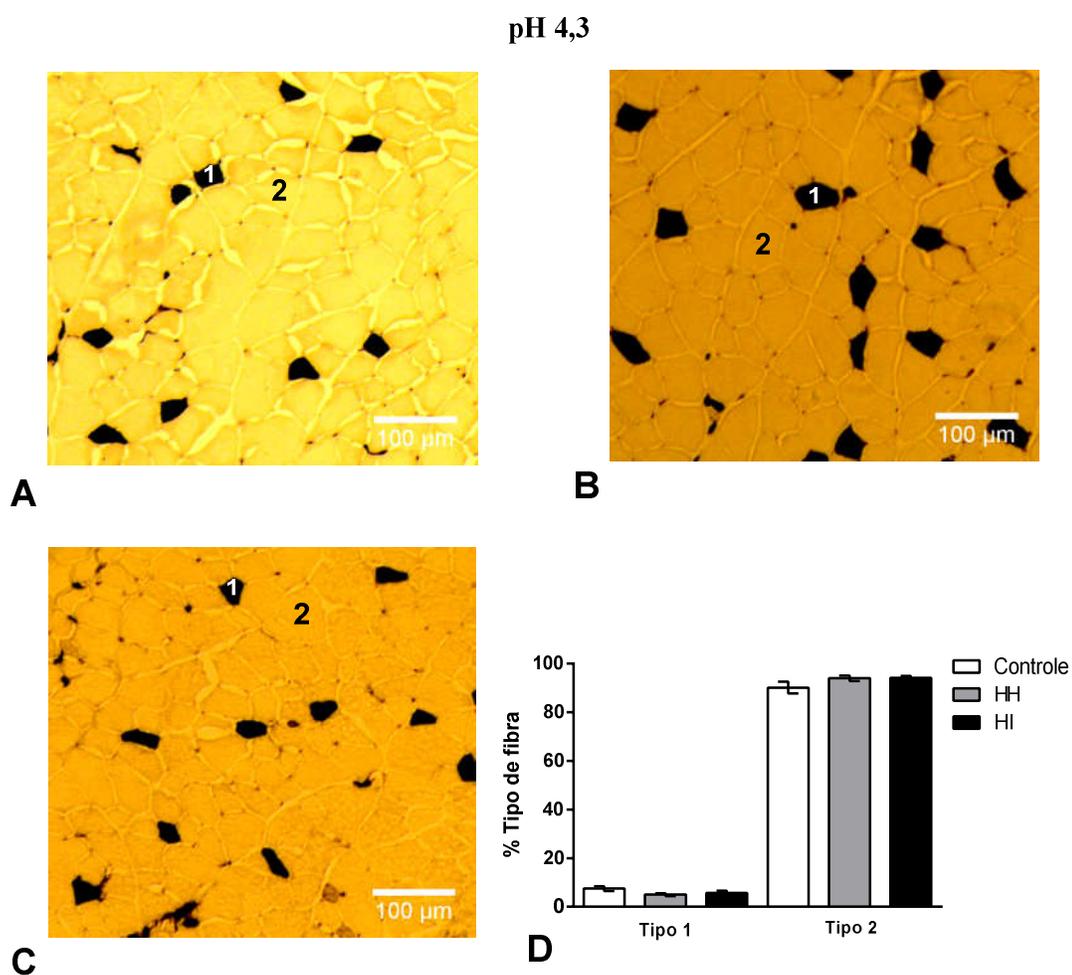
	Grupos Experimentais		
	C	HH	HI
Número de fibra por mm²			
Fibra tipo 1	204,2±10,3	230,7±7,1	196,4±9,0
Fibra tipo 2A	44,32±5,2	18,62±5,1*	33,56±9,0
Fibra tipo 2B	20,01±3,2	15,28±0,9	18,02±3,5
Perímetro da fibra (µm)			
Fibra tipo 1	194,6 (173,7-215,8)	197,4**** (178,8-219,6)	197,3**** (179,0-219,7)
Fibra tipo 2A	171,2 (156,7-184,6)	179,8**** (167,9-195,0)	180,8**** (169,7-192,2)
Fibra tipo 2B	166,7 (153,3-179,6)	172,8***## (159,3-186,4)	167,3 (152,6-182,8)
Área da fibra (µm²)			
Fibra tipo 1	2023 (1649-2446)	2083**** (1744-2512)	2112**** (1763-2523)
Fibra tipo 2A	1870 (1578-2152)	2067**** (1824-2354)	2047**** (1809-2350)
Fibra tipo 2B	1736 (1490-1997)	1782 (1535-2003)	1740 (1475-2104)

Dados do músculo sóleo dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação: C= controle; HH= Hiperlipídico-hipercalórico e HI= Hiperlipídico-isocalórico; Os dados de número de fibras musculares por mm² no pH 4,55 estão apresentados em média ± EPM; Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey; Perímetro da fibra e área de secção transversa da fibra no pH4,55 estão apresentados em mediana e percentil 25 e 75. Teste Kruskal-wallis seguido do pós-teste de Dunn's; **P*<0,05; ****P*<0,001; *****P*<0,0001 vs. C; #*P*<0,05; ##*P*<0,01 vs. HI.

Nas análises do músculo EDL, não foram observadas diferenças na proporção de fibras tipo 1 e 2 utilizando a pré-incubação no pH 4,3 (Figura 8D). Utilizando a pré-incubação

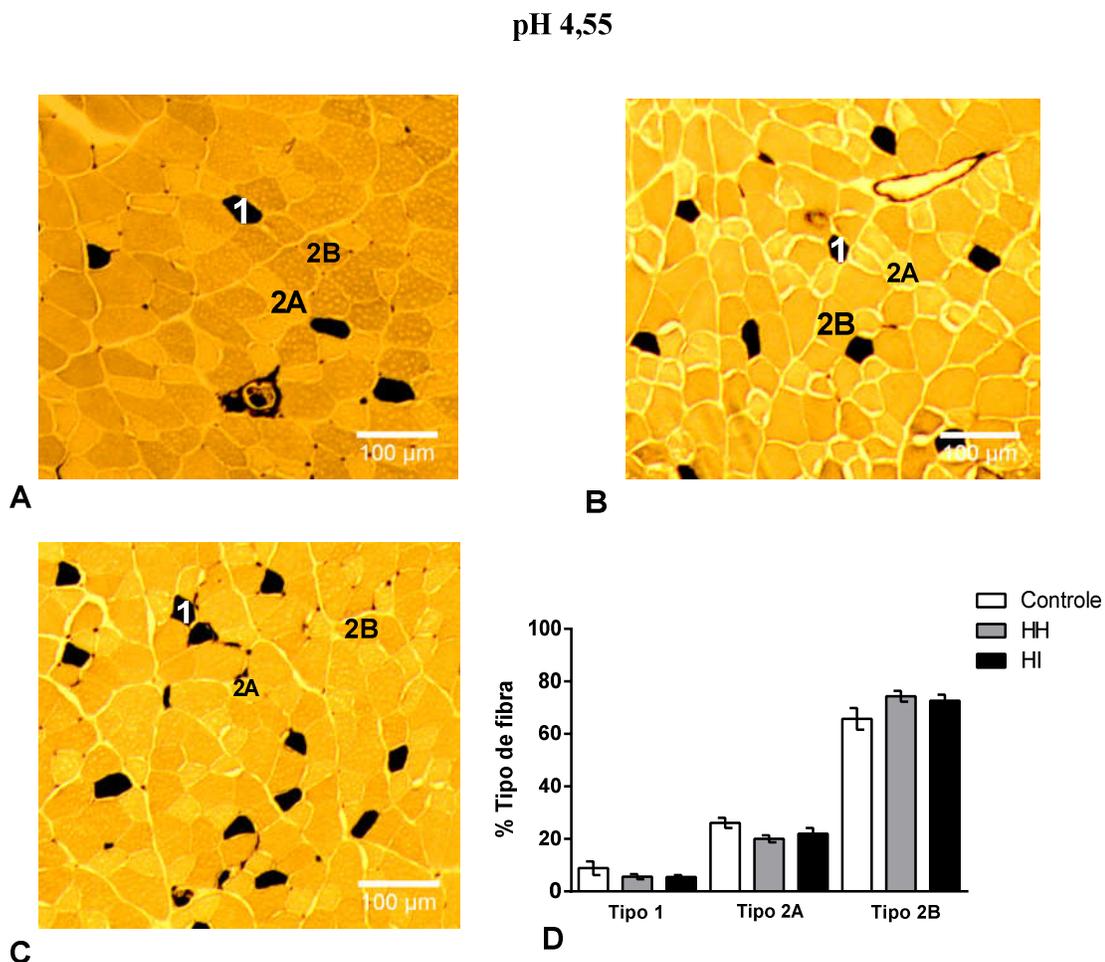
no pH 4,55, não observamos diferenças na proporção das fibras tipo 1, 2A e 2B do músculo EDL entre os grupos experimentais (Figura 9D).

Figura 8. Imagens representativas do músculo EDL (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,3.



A, B, C: Cortes transversais (objetiva 10x) do músculo EDL pré-incubados no pH 4,3 na técnica mATPase. 1: fibras do tipo 1; 2: fibras do tipo 2. (A): grupo Controle; (B): grupo Hiperlipídico-hipercalórico (HH); (C): grupo Hiperlipídico-isocalórico (HI). (D): percentual do tipo de fibra muscular no pH 4.3. Dados do músculo EDL dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação. Os dados de (D) estão apresentados em média \pm EPM. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey.

Figura 9. Imagens representativas do músculo EDL (mATPase) e percentual do tipo de fibra no pH 4,55.



A, B, C: Cortes transversais (objetiva 10x) do músculo EDL pré-incubados no pH 4,55 na técnica mATPase. 2A: fibras do tipo 2A; 2B: fibras do tipo 2B. (A): grupo Controle; (B): grupo Hiperlipídico-hipercalórico (HH); (C): grupo Hiperlipídico-isocalórico (HI). (D): percentual do tipo de fibra muscular no pH 4,55. Dados do músculo EDL dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação Os dados de (D) estão apresentados em média \pm EPM. Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey.

Em relação ao número de fibras, também não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, utilizando o pH 4,55 (Tabela 5).

Quanto ao perímetro da fibra, foi observado menor perímetro das fibras tipo 1 nos animais dos grupos HH e HI comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,01$ HH vs. C; $p < 0,0001$ HI vs. C) (Tabela 5). Os animais HH apresentaram maior perímetro das fibras tipo 1 comparados aos animais do grupo HI ($p < 0,001$ HH vs. HI) (Tabela 5). Quanto às fibras tipo

2A, os animais do grupo HH e HI apresentaram menor perímetro da fibra comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ HH vs. C; $p < 0,0001$ HI vs. C) (Tabela 5). Foi observado também que o perímetro da fibra tipo 2A dos animais do grupo HH foi maior comparado aos animais do grupo HI ($p < 0,0001$ HH vs. HI) (Tabela 5). Em relação ao perímetro das fibras tipo 2B, foi observado aumento nos animais do grupo HH comparados aos animais do grupo controle e HI ($p < 0,0001$ vs. C e HI). Os animais do grupo HI também apresentaram menor perímetro da fibra tipo 2B comparado aos animais controle ($p < 0,01$ HI vs. C) (Tabela 5).

Em relação à área da secção transversa da fibra, os animais que receberam ambas as dietas hiperlipídicas apresentaram menor área da fibra tipo 1 comparados aos animais controle ($p < 0,001$ HH vs. C; $p < 0,0001$ HI vs. C) (Tabela 5). Nos animais do grupo HH, foi observado maior área da secção transversa da fibra tipo 1 comparado aos animais HI ($p < 0,001$ HH vs. HI) (Tabela 5). Quanto ao tipo fibra 2A, foi observada menor área nos animais do grupo HH e HI comparados aos animais controle ($p < 0,01$ HH vs. C; $p < 0,0001$ HI vs. C) (Tabela 5). Os animais HH apresentaram maior área da secção transversa da fibra tipo 2A comparado aos animais do grupo HI ($p < 0,0001$ HH vs. HI) (Tabela 5). A área da secção transversa da fibra tipo 2B foi maior nos animais do grupo HH comprado aos animais controle e HI ($p < 0,001$ vs. C; $P < 0,0001$ vs. HI) (Tabela 5). Foi observado também que os animais HI apresentaram menor área da secção transversa da fibra tipo 2B comparados aos animais controle ($p < 0,0001$ HI vs. C) (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros morfométricos do músculo EDL.

	Grupos Experimentais		
	C	HH	HI
Número de fibra por mm²			
Fibra Tipo 1	36,02±13,52	22,91±3,89	24,51±3,54
Fibra Tipo 2A	108,7±10,92	82,81±7,54	98,42±11,01
Fibra Tipo 2B	270,7±18,05	304,7±14,72	325,6±13,08
Perímetro da fibra µm			
Fibra Tipo 1	99,19 (89,17-110,7)	97,25^{#####} (85,98-106,3)	92,00^{****} (83,95-102,1)
Fibra Tipo 2A	116,4 (107,6-125,1)	114,9^{#####} (106,4-124,0)	110,8^{****} (104,0-118,1)
Fibra Tipo 2B	146,0 (132,5-164,3)	151,8^{#####} (134,0-168,6)	145,4^{**} (128,5-163,9)
Área da fibra µm²			
Fibra Tipo 1	558,4 (464,9-673,9)	535,0^{#####} (435,3-633,9)	490,2^{****} (420,9-589,6)
Fibra Tipo 2A	867,6 (737,7-984,9)	838,3^{#####} (726,3-960,9)	790,6^{****} (699,7-891,0)
Fibra Tipo 2B	1405 (1175-1745)	1495^{#####} (1186-1816)	1380^{****} (1105-1707)

Dados do músculo EDL dos filhotes de mães submetidas às dietas experimentais durante a gestação e lactação: C= controle; HH= Hiperlipídico-hipercalórico e HI= Hiperlipídico-isocalórico; Os dados de número de fibras musculares por mm² pH 4.55 estão apresentados em média ± EPM; Teste ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey; Perímetro da fibra e área de secção transversa da fibra pH 4.55 estão apresentados em mediana mediana e percentil 25 e 75. Teste Kruskal-wallis seguido do pós-teste de Dunn's; **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001; *****P*<0,0001 vs. C; #####*P*<0,0001 vs. HI.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar as repercussões do consumo das dietas hiperlipídicas hipercalórica ou isocalórica, durante a gestação e lactação, sobre a morfologia do músculo esquelético da prole. Nossos resultados demonstraram que a ingestão materna da dieta hiperlipídica-hipercalórica aumentou a proporção das fibras tipo 1, a área de secção transversa e o perímetro das fibras tipo 1 e 2A no músculo sóleo. Enquanto que no músculo EDL, observamos redução do tamanho das fibras tipo 1 e 2A e aumento do tamanho das fibras tipo 2B. Quando analisamos os resultados em relação ao consumo da dieta hiperlipídica-isocalórica materna, também observamos aumento do tamanho das fibras tipo 1 e 2A, sem nenhuma alteração nas fibras tipo 2B e na proporção das fibras no músculo sóleo. Contudo, no músculo EDL, houve redução do tamanho dos três tipos de fibras analisados (tipo 1, 2A e 2B).

Inicialmente, foram avaliados parâmetros de desempenho materno para acompanhamento do efeito direto das dietas. Em relação ao consumo alimentar total materno, as matrizes que receberam a dieta hiperlipídica-hipercalórica apresentaram menor consumo que os animais controle e HI durante a gestação e lactação. Esses resultados também foram reportados anteriormente em trabalhos similares. Guo e Jen (1995) utilizaram dieta hiperlipídica-hipercalórica (64% lipídio/5,6Kcal/g) durante a gestação e lactação, ou apenas em um desses períodos, e verificaram redução no consumo alimentar. Pantaleão e colaboradores (2013) utilizaram dieta hiperlipídica (65% lipídio 5,49 Kcal/g) e também verificaram menor ingestão alimentar, durante a adaptação, gestação e lactação. Essa alteração no consumo alimentar pode refletir um mecanismo adaptativo, que promove um ajuste no consumo alimentar, buscando alcançar o aporte energético suficiente para atender as necessidades do animal (JACOB *et al.*, 2013).

Em nosso estudo não observamos diferenças na ingestão energética das matrizes na gestação ou lactação. Semelhante aos nossos resultados, a exposição à dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio/5,24Kcal/g) (PURCELL *et al.*, 2011) ou (65% lipídio/5,49 Kcal/g) (PANTALEAO *et al.*, 2013) em ratas durante a gestação e lactação também não promoveu diferença na ingestão energética. Em contraste com estes estudos, Tamashiro e colaboradores (2009) observaram aumento da ingestão energética em ratas Sprague-Dawley expostas à dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio/ 5,24Kcal/g) durante os períodos de gestação e lactação. Concomitantemente com a ingestão isoenergética das matrizes não houve diferenças no peso corporal e no ganho de peso corporal das matrizes na gestação ou lactação. Deste

modo, o peso corporal das matrizes pode estar relacionado à sua ingestão energética. Outros estudos já citados anteriormente nesta discussão, que reportaram semelhante ingestão energética das matrizes, também não observaram diferenças no ganho de peso corporal na gestação ou lactação (PURCELL *et al.*, 2011; PANTALEAO *et al.*, 2013). Enquanto que o aumento da ingestão energética por matrizes expostas a dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio) foi acompanhado do maior percentual de ganho de peso corporal na gestação (TAMASHIRO *et al.*, 2009). Evidenciando a importância da ingestão energética na manutenção do peso corporal.

Com relação aos parâmetros de crescimento somático da prole, observamos que os filhotes das mães que consumiam dieta hiperlipídica-hipercalórica apresentaram maior peso corporal aos 21 dias e maior percentual de ganho de peso do 1º ao 21º dia pós-natal. Semelhante aos nossos resultados, o consumo da dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio/ 5,24 kcal/g) por ratas Wistar (MARCO *et al.*, 2014) ou dieta hiperlipídica (58% lipídio) por fêmeas C57BL/6J (ODAKA *et al.*, 2010) durante a gestação e lactação promoveram maior peso corporal da prole aos 21 dias de idade. Em contraste com esses resultados, a dieta hiperlipídica hipercalórica (65% lipídio/5,49 Kcal/g) (PANTALEAO *et al.*, 2013) ou a dieta de cafeteria (24% carboidratos simples, 19,15% lipídio/ 4,16 Kcal/g) (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005) durante a gestação e lactação não promoveu alterações no peso corporal ao desmame ou percentual de ganho de peso na lactação.

O aumento do peso corporal e maior percentual de ganho de peso na lactação observado ao desmame dos filhotes cujas mães consumiam a dieta hiperlipídica hipercalórica pode estar relacionado às diferenças na composição do leite materno. O leite materno é a principal fonte de nutrição dos neonatos, e alterações na sua composição pode afetar o desenvolvimento da prole (CHEN *et al.*, 2017). A composição de ácidos graxos do leite materno é altamente suscetível às alterações dietéticas e ao estado nutricional das matrizes (JENSEN, 1999). Estudos têm buscado investigar os efeitos do consumo de dietas hiperlipídicas sobre a composição do leite materno. Purcell e colaboradores (2011) utilizaram dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio) em ratas Sprague-Dawley durante a gestação e lactação e observaram aumento do conteúdo total de lipídio no leite das matrizes a partir do 10º dia pós-natal até o desmame, além de alto teor energético e proteico aos 21 dias pós-natal. Em estudo semelhante, Del Prado e colaboradores (1997) observaram aumento da concentração de lipídio, maior volume diário de leite e alta produção de lipídio, proteína, lactose e energia total avaliados entre o 12º e 14º dia pós-natal, em ratas Sprague-Dawley que

consumiam dieta hiperlipídica isocalórica (20 g de lipídeos/100 g de dieta) durante a gestação e lactação.

Além disso, a exposição dos filhotes à dieta hiperlipídica, também pode ter influenciado no maior peso corporal, tendo em vista que poucos dias antes do dia oficial do desmame aos 22 dias, os ratos começam a consumir a dieta independentemente. Em estudo realizado por Doerflinger e colaboradores (2004) filhotes expostos a dieta hiperlipídica hipercalórica (40% lipídio) durante a gestação e lactação iniciaram ingestão de alimentos sólidos independentemente 1 dia mais cedo que os filhotes expostos à dieta controle (10% lipídio). Apesar de não ter sido avaliado o início do consumo da dieta materna pelos filhotes, mas, é possível que a exposição à dieta materna hiperlipídica hipercalórica tenha influenciado nesse início com consequente repercussão sobre o ganho de peso corporal.

Ainda com relação aos parâmetros de crescimento somático, observamos que os filhotes do grupo HI, apesar do mesmo teor de lipídio da dieta, apresentaram redução do peso corporal e do percentual de ganho de peso corporal. É possível que a quantidade de celulose adicionada na formulação da dieta hiperlipídica isocalórica (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017) para o ajuste da densidade energética tenha influenciado na composição do leite materno e sua concentração de lipídio. Del Prado e colaboradores (1997) em sua dieta hiperlipídica isocalórica utilizaram 25,7g de celulose /100g de dieta e verificaram aumento da concentração de lipídio no leite materno e diferentemente do nosso estudo, foi observado maior ganho de peso corporal na prole. Apesar deste estudo, é possível que a dieta utilizada em nosso estudo tenha promovido alterações na composição do leite das matrizes e ou alterações na absorção de alguns nutrientes importantes para o crescimento. Godara e colaboradores (1981) observaram aumento da excreção fecal de cálcio, ferro e fósforo em adolescentes com suplementação de celulose na dieta, indicando que o aumento de fibra insolúvel como a celulose na dieta pode afetar a absorção de minerais, e isso poderia em nosso estudo refletir no menor peso corporal, eixo longitudinal e percentual de ganho de peso do filhotes.

Quanto ao peso corporal após o desmame, em nosso estudo, não observamos diferenças entre os grupos com relação ao peso corporal e índice de Lee aos 70 dias e ganho de peso corporal dos 21 aos 70 dias. Semelhante aos nossos resultados, o consumo de dieta hiperlipídica hipercalórica durante os períodos de gestação e lactação não promoveu alteração do peso corporal da prole de ratos Sprague dawley (TAMASHIRO *et al.*, 2009; HELLGREN *et al.*, 2014) ou camundongos C57BL/6J (ALFARADHI *et al.*, 2016) aos 70 dias de idade. Em contraste com esses estudos, a exposição a dieta hiperlipídica hipercalórica nos períodos

de gestação e lactação promoveu maior peso corporal e maiores índices de adiposidade na prole aos 150 dias (PILEGGI *et al.*, 2016b) e 168 dias (DESAI *et al.*, 2014).

Diferenças nas composições dietéticas podem influenciar os resultados encontrados. Um maior percentual de lipídio da dieta parecem influenciar no peso corporal da prole adulta. No estudo de Desai e colaboradores (2014), em que foram observaram aumento do peso corporal da prole na vida adulta, foi utilizado (60% de lipídio). Enquanto que Alfaradhi e colaboradores (2016) utilizaram em sua composição dietética, menor percentual de lipídio (45% lipídio) e não observaram alteração no peso corporal da prole. Esse último estudo se aproxima ao nosso, cuja contribuição do lipídio foi de (51% lipídio) (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). É importante destacar ainda que alterações no peso corporal da prole podem também estar relacionadas com a idade. Estudos utilizando dieta hiperlipídica hipercalórica materna durante os períodos de gestação e lactação em que avaliaram a prole mais tardiamente, com idade acima de 150 dias, foram observadas alterações no peso corporal (DESAI *et al.*, 2014; PILEGGI *et al.*, 2016b). Enquanto que Hellgren e colaboradores (2014) e Alfaradhi e colaboradores (2016) também utilizando dieta hiperlipídica hipercalórica materna não observaram diferenças no peso corporal da prole avaliada aos 70 dias de idade, em que esses animais são considerados um rato adulto jovem (SENGUPTA, 2013). Apontando a importância da idade nas repercussões sobre o peso corporal da prole.

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças nas respostas glicêmicas no teste de tolerância à glicose aos 61 dias e à insulina aos 65 dias. Masuyama e colaboradores (2012) reportaram em seu estudo que o consumo da dieta hiperlipídica hipercalórica (62% lipídio) por fêmeas ICR durante a gestação não promoveu alterações nas respostas glicêmicas do GTT, ITT ou HOMA IR na prole às 12 semanas de idade. Em contraste com esses resultados, Pantaleão e colaboradores (2013) utilizaram dieta hiperlipídica (65% lipídio) 10 dias antes do acasalamento e durante a gestação e lactação, observaram maior área sob a curva no GTT e menor taxa de decaimento de glicose no ITT da prole aos 21 dias. Indicando distúrbios no metabolismo da glicose caracterizados por prejuízos na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (PANTALEAO *et al.*, 2013). É importante destacar que em nosso estudo os ratos foram submetidos aos testes aos 61 e 65 dias de idade sendo considerado adulto jovem e não excluir a possibilidade que desordens metabólicas possam ocorrer mais tardiamente. Em outro estudo, o consumo da dieta hiperlipídica hipercalórica (49% lipídio/4,94kcal/g) em camundongos fêmeas C57BL/6 durante os períodos de gestação e lactação promoveu anormalidades na distribuição das células alfa e aumento do diâmetro das ilhotas no pâncreas da prole aos 90 dias, sem que os animais apresentassem resistência à insulina ou alguma

característica sugestiva para diabetes mellitus tipo 2 (GREGORIO *et al.*, 2013). Essas alterações, segundo os autores, podem sugerir um estado compensatório do órgão devido aumento da demanda metabólica em casos de metabolismo de carboidratos alterado, podendo a diabetes tipo 2 ser desenvolvida a longo prazo através de mudança da dieta após o desmame (GREGORIO *et al.*, 2013).

Estudos utilizando modelo animal têm demonstrado que o consumo da dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica durante a gestação ou gestação e lactação pode promover o aumento do conteúdo de lipídio intramuscular e comprometer a sensibilidade à insulina no músculo (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; SHELLEY *et al.*, 2009) sendo considerado um marcador de resistência à insulina em todo corpo (HEGARTY *et al.*, 2003). Além disso, a redução da quantidade de fibras oxidativas tipo 1, concomitantemente com o aumento de fibras tipo glicolíticas 2B tem sido associada com obesidade e resistência à insulina (NYHOLM *et al.*, 1997; TANNER *et al.*, 2002b). Pileggi e colaboradores (2016a) avaliaram as repercussões do consumo da dieta hiperlipídica (45% lipídio) materna sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e observaram redução da expressão de mRNA do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), GLUT4, acompanhado da redução da expressão gênica de MHC tipo 1, aos 150 dias de idade, também indicando alterações no metabolismo de glicose.

Contudo, em nosso trabalho quando analisada a morfologia do músculo sóleo, o consumo da dieta hiperlipídica hipercalórica materna aumentou a proporção de fibras tipo 1 e a área de secção transversa das fibras tipo 1 e 2A. É possível que a maior proporção de fibras do tipo 1 observada nos animais submetidos à dieta hiperlipídica-hipercalórica tenha contribuído para manter a sensibilidade à insulina normal, tendo em vista que as fibras do tipo 1 possuem maior capacidade de captação de glicose (BASS *et al.*, 1969), além de uma maior eficiência na remoção da glicose do sangue (PATTI *et al.*, 2003).

Os nossos resultados podem indicar ainda que o músculo sóleo dos animais cujas mães consumiram dieta hiperlipídica-hipercalórica aumentou o seu perfil oxidativo. Em estudo realizado por Turner e colaboradores (2007) a intervenção com dieta hiperlipídica (45% lipídio) durante 20 semanas aumentou a capacidade oxidativa e conteúdo proteico de PGC-1 α no músculo quadríceps. Enquanto que De Wilde e colaboradores (2008) observaram que 28 dias de intervenção, utilizando dieta hiperlipídica (45% lipídio), aumentou os níveis de MHC tipo 1 e PGC-1 α também no músculo quadríceps. Esses resultados sugerem que a dieta hiperlipídica promove a capacidade oxidativa e a transição de fibras rápidas para lenta.

No músculo sóleo, o aumento das fibras tipo1 e redução das fibras tipo 2A observados em nosso estudo, nos animais cujas mães consumiram a dieta hiperlipídica-hipercalórica durante a gestação e lactação podem estar relacionados com as seguintes hipóteses: aumento na ativação da via receptor ativado por proliferador de peroxissoma delta (PPAR δ) no músculo esquelético e influência de hormônios tireoideanos.

Em relação à 1ª hipótese, estudos têm relacionado o consumo de dieta hiperlipídica com alteração na expressão do PPAR δ , tendo em vista que os ácidos graxos são ligantes endógenos naturais para responsáveis por ativar diferentes PPARs (FORMAN, CHEN e EVANS, 1997). Kanisto e colaboradores (2006) sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica hipercalórica (55% lipídio/ 4,8 kcal/g) por ratas wistar durante 4 semanas induziu expressão de PPAR δ no músculo gastrocnêmico e essa expressão foi positivamente correlacionado com a concentração sérica de ácidos graxos livres. Em outro estudo, Hancock e colaboradores (2008) observaram que o consumo de dieta hiperlipídica (50% lipídio) por ratos wistar durante 4 semanas promoveu superexpressão de receptores ativados por (PPAR δ) e do coativador 1-alfa do Receptor gama Ativado por Proliferador de peroxima (PGC1- α) no músculo tibial anterior.

A superexpressão de PPAR δ em camundongos transgênicos (MCK-PPAR δ) promoveu aumento da expressão do gene da MHC tipo 1 (*Myh7*) e redução da expressão MHC tipo 2A (*Myh2*), 2X (*Myh1*) e 2B (*Myh4*) no músculo sóleo (GAN *et al.*, 2013). Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são receptores nucleares que possuem 3 isoformas: PPAR α , PPAR e PPAR δ (BERGER e MOLLER, 2002) e atuam na regulação do metabolismo de lipídio e homeostase energética (BARBIER *et al.*, 2002). O PPAR δ é a isoforma mais predominante no músculo esquelético (WANG *et al.*, 2004b) e está envolvido na determinação do tipo de fibra muscular (WANG *et al.*, 2004a; GAN *et al.*, 2013).

Os PPARs necessitam de cofatores que modificam e alteram a estrutura da cromatina para influenciar a atividade transcricional (EHRENBORG e KROOK, 2009). O PGC1- α é um importante cofator regulador do metabolismo oxidativo e da biogênese mitocondrial, que se liga e coativa grande parte dos receptores nucleares, incluindo o PPAR δ (EHRENBORG e KROOK, 2009). A superexpressão de PGC1- α no músculo esquelético (LIN *et al.*, 2002) promoveu efeitos semelhantes da superexpressão do PPAR δ com transição das fibras do tipo 2 para tipo 1 (WANG *et al.*, 2004a). Kleiner e colaboradores (2009) observaram que a ativação farmacológica do PPAR δ endógeno por (GW501516) músculo-específico resultou na ativação de genes envolvidos no metabolismo de lipídio carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1b), piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4) e proteína desacopladora (UCP3) em

miotubos primários e que o PGC1- α foi essencial para completa ativação da expressão gênica de CPT1b e PDK4 via PPAR δ . Alguns estudos já citados nessa discussão evidenciaram o aumento do conteúdo proteico de PGC1- α utilizando dieta hiperlipídica-hipercalórica (45%lipídio) durante 20 semanas (TURNER *et al.*, 2007) ou 28 dias (DE WILDE *et al.*, 2008). É possível que em nosso estudo, a exposição à dieta hiperlipídica hipercalórica tenha aumentado a expressão de PPAR δ e PGC1- α , e assim influenciado na composição do tipo de fibra.

Em relação à modulação de hormônios tireoidianos, devemos observar que o hormônio triiodotironina (T3) é considerado um regulador do desenvolvimento do músculo e determinante na transição das isoformas de MHC (LEE, KIM e MILANESI, 2014). Em estudo realizado por Caiozzo e colaboradores (2000) a indução de hipotireoidismo por propiltiouracil em ratas Sprague-Dawley promoveu transição de MHC com aumento da isoforma tipo 1 e redução das isoformas tipo 2X e 2B, e aumento de fibras híbridas com co-expressão de isoformas de MHC no músculo plantar, evidenciando a importância da biodisponibilidade de T3 sobre expressão de isoformas de MHC. Suter e colaboradores (2012) utilizaram dieta hiperlipídica (32% lipídio) em macacas-japonesas durante a gestação e observaram na prole uma significativa redução dos níveis séricos de T4 e dos genes necessários para produção do hormônio da tireoide no hipotálamo e na glândula tireoide. Em outro estudo, utilizando dieta hiperlipídica hipercalórica suplementada com 15% de banha de porco, (4,14 Kcal/g de dieta) por 24 semanas, ratos Sprague-Dawley apresentaram redução dos níveis sérios de T4 e da expressão de proteínas relacionadas síntese do hormônio da tireoide (SHAO *et al.*, 2014).

A ação do hormônio T3 no tecido é regulada por enzimas deiodinases (DIO), que são capazes de ativar T4 a T3 (DIO1 e DIO2) e inativar ambos T4 e T3 (DIO3) (MAIA *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual a transição da MHC pode ocorrer pela ação do T3 é mediada por receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TR) que atuam na regulação da transcrição gênica (CHENG, 2000). As duas principais isoformas dos receptores são TR α e TR β , ambos os receptores estão presentes no músculo esquelético, com uma maior predominância do TR α (WHITE e DAUNCEY, 1999). YU e colaboradores (2000) em estudos com camundongos geneticamente modificados deficientes para expressar receptores TR α_1 e/ou TR β observaram aumento da isoforma de MHC tipo 1 no músculo sóleo de animais com a ausência dos receptores TR α , enquanto a ausência dos dois receptores TR α_1 e β promoveu mudança na isoforma de MHC do tipo 2A para tipo 1.

Os estudos citados acima, indicam que a exposição à dieta hiperlipídica seja durante a gestação e lactação ou na vida adulta é capaz de promover alterações na biodisponibilidade do hormônio da tireoide. É possível que em nosso estudo, o consumo da dieta hiperlipídica hipercalórica tenha induzido redução dos níveis circulatórios de T3 e consequente alteração da sinalização do hormônio da tireoide durante o desenvolvimento do músculo esquelético.

Diferentemente do observado no músculo sóleo, no músculo EDL, não foram encontradas diferenças na distribuição da proporção de fibras e no número de fibras utilizando ambas as dietas hiperlipídicas. O músculo EDL, predominantemente glicolítico, parece apresentar uma menor suscetibilidade à insultos nutricionais. Aragão e colaboradores (2014) analisaram os músculos sóleo e EDL de ratos submetidos à dieta hipoproteica durante a gestação e lactação e observaram alterações na densidade das fibras musculares e alterações na taxa de oxidação de lipídio e glicose no músculo sóleo, mas não no EDL. Estudos têm sugerido que o T3 possui diferentes efeitos sobre a expressão gênica em diferentes tipos de fibras (GUSTAFSON, MARKHAM e MORKIN, 1986; CAIOZZO e HADDAD, 1996) e que os músculos com predominância de fibras lentas são mais sensíveis aos efeitos do hormônio da tireoide (LARSSON *et al.*, 1994). Haddad e colaboradores (1998) observaram alta densidade de TRs em músculo sóleo com predominância de fibras tipo 1 do que no músculo gastrocnêmio medial rico em fibras tipo 2, que pode estar relacionado com maior sensibilidade das fibras musculares tipo 1.

Em nosso estudo, observamos menor número de fibras do tipo 2A no músculo sóleo dos animais HH. Este resultado pode refletir em hipoplasia do músculo esquelético ou ser consequência da transição das fibras do tipo 2A para as fibras do tipo 1. Em estudos utilizando a dieta hiperlipídica hipercalórica (65% lipídio/5,49 Kcal/g) (PANTALEAO *et al.*, 2013) ou de cafeteria (24% carboidratos simples, 19,15% lipídio/ 4,16Kcal/g) (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005) nos períodos de gestação e lactação, foram observadas redução no número de fibras nos músculos gastrocnêmio e semitendinoso, respectivamente, da prole ao desmame. Segundo Bayol, Simbi e Stickland (2005) é provável que a hipoplasia observada permaneça na vida adulta, tendo em vista que em ratos a hiperplasia do músculo esquelético cessa em torno do período do desmame (RAYNE e CRAWFORD, 1975). Desta forma, podendo sugerir uma redução do desenvolvimento do músculo esquelético. O menor número de fibras tipo 2A pode ainda estar relacionado à transição do tipo de fibra. Em outro estudo já citado nesta discussão foi evidenciado mudança da isoforma de MHC do tipo 2A pra tipo 1, através da alteração na expressão dos receptores tiroidianos no músculo esquelético, essa

modificação ocorreu concomitantemente com redução na proporção das fibras tipo 2A, resultados que se assemelham aos encontrados em nosso estudo (YU *et al.*, 2000)..

Em relação aos nossos resultados sobre a área de secção transversa (do inglês cross-sectional area, CSA) das fibras musculares, observamos que o consumo materno das dietas hiperlipídica-hipercalórica ou hiperlipídica-isocalórica promoveu aumento da CSA nas fibras tipo 1 e 2A no músculo sóleo. Diferentemente aos nossos resultados, Pileggi e colaboradores (2016a) utilizaram dieta hiperlipídica (45% lipídio) materna e não observaram diferenças na área das fibras tipo 1 e 2A no músculo sóleo da prole aos 150 dias. Enquanto que a exposição à dieta hiperlipídica hipercalórica (60% lipídio) na vida adulta (10 semanas de idade), semelhante aos nossos resultados, aumentou a área da secção transversa das fibras tipo 1 e 2A (SHORTREED *et al.*, 2009). Em nosso estudo, apesar do aumento da área de secção transversa, não observamos diferenças no peso bruto ou peso relativo dos músculos sóleo e EDL analisados, resultados semelhantes revelados em outros estudos utilizando dieta hiperlipídica materna (BAYOL, SIMBI e STICKLAND, 2005; PANTALEAO *et al.*, 2013; PILEGGI *et al.*, 2016a).

O aumento da área de secção transversa das fibras pode estar relacionado ao aumento síntese proteica e da ativação das células satélites. O crescimento do músculo esquelético no desenvolvimento pós-natal envolve o aumento de mionúcleos e hipertrofia (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Em mamíferos, o número de mionúcleos é positivamente relacionado à área de secção transversa das fibras (EDGERTON e ROY, 1991). Recentes estudos têm revelado que a sinalização do peptídeo obestatina/receptor acoplado à proteína G (GPR39) estimulam o crescimento e ativação de células satélites no músculo esquelético (GURRIARAN-RODRIGUEZ *et al.*, 2012; GURRIARAN-RODRIGUEZ *et al.*, 2015; SANTOS-ZAS *et al.*, 2017). Gurriaran-Rodriguez e colaboradores (2015), observaram que a administração de obestatina 3 dias após a diferenciação em células C2C12 resultou em hipertrofia e maior adição de núcleos em miotubos. Em outro estudo realizado por Slupecta e colaboradores (2016) o consumo de dieta hiperlipídica hipercalórica (30% lipídio) durante a gestação e lactação por ratas Wistar, promoveu o aumento da concentração de obestatina no leite materno no 21º dia de lactação e no plasma da prole. É possível que em nosso estudo o consumo tenha promovido aumento da concentração de obestatina e assim contribuído para o aumento da área de secção transversa observada nas fibras.

Novamente, o músculo EDL respondeu diferentemente do músculo sóleo em relação à CSA. Os animais do grupo HI apresentaram redução do tamanho dos três tipos de fibras, 1, 2A e 2B, enquanto que nos animais HH observamos redução das fibras tipo 1 e 2A.

Semelhante aos nossos resultados, Bayol e colaboradores (2005) utilizando dieta de cafeteria durante os períodos de gestação e lactação observaram redução da CSA do músculo semitendinoso da prole aos 21 dias pós natal, sem nenhuma alteração do peso do músculo. A hipertrofia da fibra muscular pode ocorrer por ativação da via AKT-mTOR (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Em estudo utilizando a dieta hiperlipídica hipercalórica (65% lipídio/5,49 Kcal/g) foi observado redução da sinalização mTOR do músculo da prole ao desmame (PANTALEAO *et al.*, 2013). É provável que o consumo materno de ambas as dietas hiperlipídicas possam ter promovido alterações nas vias de sinalização para hipertrofia da fibra muscular.

Em resumo, pudemos observar que o consumo materno das duas dietas hiperlipídicas utilizadas em nosso estudo apresentaram diferentes respostas no músculo sóleo e EDL e quanto à proporção e tamanho das fibras na prole.

8 CONCLUSÃO

O consumo da dieta hiperlipídica-hipercalórica durante a gestação e lactação promoveu maiores repercussões sobre a composição das fibras musculares dos músculos sóleo e EDL do que o consumo da dieta hiperlipídica-isocalórica na prole aos 70 dias de vida. Os animais expostos a dieta HH, no período perinatal, apresentaram aumento do perfil oxidativo do músculo sóleo através do aumento da proporção e tamanho das fibras oxidativas, enquanto que no músculo EDL houve a preservação do perfil glicolítico, através do aumento no tamanho das fibras puramente glicolíticas e redução das fibras oxidativas. O consumo da dieta HI não foi capaz de alterar a proporção das fibras musculares do músculo sóleo e EDL, contudo, aumentou o tamanho das fibras oxidativas no músculo sóleo. O aumento na ativação da via do PPAR δ nas fibras musculares e/ou a redução dos níveis circulatórios de T3 são possíveis mecanismos que podem estar relacionados às alterações morfológicas observadas em resposta ao aumento da biodisponibilidade de lipídios e calorias no período crítico para o desenvolvimento e diferenciação das fibras musculares. Essas alterações são concomitantes com a não variação do peso corporal e metabolismo de glicose. Sendo assim, diante dos resultados obtidos, a hipótese deste trabalho foi refutada.

8.1 PERSPECTIVAS

Para maiores esclarecimentos dos resultados encontrados neste trabalho e a complementação deste, temos as seguintes perspectivas:

Avaliar nas mães:

- Composição de lipídios, proteínas e concentração de obestatina no leite materno;
- Concentrações séricas dos hormônios tireoidianos;
- Níveis séricos de corticosterona.

Avaliar nos filhotes:

- Lipídio intramuscular aos 22 e aos 70 dias de idade;
- Repercussões do consumo das dietas hiperlipídicas à curto prazo sobre a morfologia e tipologia dos músculos sóleo e EDL ao desmame;
- Concentrações séricas dos hormônios tireoidianos;
- Expressão proteica e gênica do sistema obestatina/GPR39, de PGC1- α e PPAR δ , no músculo esquelético;
- Capacidade oxidativa e conteúdo mitocondrial das fibras musculares.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, P. J.; THAYER, R.; TAYLOR, A. W. Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A review. **Sports Med**, v. 10, n. 6, p. 365-389, Dec 1990.
- AGUILERA, O. et al. Epigenetics and environment: a complex relationship. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 1, p. 243-251, 2010.
- ALFARADHI, M. Z. et al. Maternal Obesity in Pregnancy Developmentally Programs Adipose Tissue Inflammation in Young, Lean Male Mice Offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 11, p. 4246-4256, Nov 2016.
- ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 1, p. 3-8, May 15 2005.
- BARBET, J. P.; THORNELL, L. E.; BUTLER-BROWNE, G. S. Immunocytochemical characterisation of two generations of fibers during the development of the human quadriceps muscle. **Mech Dev**, v. 35, n. 1, p. 3-11, Aug 1991.
- BARBIER, O. et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 5, p. 717-726, May 1 2002.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.
- BARROS, K. M. et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci**, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, Feb-Apr 2006.
- BASS, A. et al. Metabolic Differentiation of Distinct Muscle Types at the Level of Enzymatic Organization. **European Journal of Biochemistry**, v. 10, n. 2, p. 198-206, 1969.
- BAYOL, S. A.; BRUCE, C. R.; WADLEY, G. D. Growing healthy muscles to optimise metabolic health into adult life. **J Dev Orig Health Dis**, v. 5, n. 6, p. 420-434, Dec 2014.
- 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. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 3, p. 951-961, Sep 15 2005.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 409-435, 2002.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-528, Apr 1968.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 01 2002.

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

BOYLE, K., & FRIEDMAN, J. MATERNAL OBESITY AND OXIDATIVE STRESS IN THE FETUS: MECHANISMS UNDERLYING EARLY LIFE SHIFTS IN SKELETAL MUSCLE METABOLISM. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 22, n. 3, p. 219-246, 2011.

BRACK, A. S.; RANDO, T. A. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 504-514, May 04 2012.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**, v. 23, n. 4, p. 369-379, Oct 1970.

BUCKINGHAM, M. et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J Anat**, v. 202, n. 1, p. 59-68, Jan 2003.

BUCKINGHAM, M.; MAYEUF, A. Chapter 52 - Skeletal Muscle Development A2 - Hill, Joseph A. In: OLSON, E. N. (Ed.). **Muscle**. Boston/Waltham: Academic Press, 2012. p.749-762. ISBN 978-0-12-381510-1.

BUSCHER, D.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. **Cell Tissue Res**, v. 296, n. 1, p. 131-139, Apr 1999.

BUTLER-BROWNE, G. S.; BARBET, J. P.; THORNELL, L. E. Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. **Anat Embryol (Berl)**, v. 181, n. 6, p. 513-522, 1990.

BUTLER-BROWNE, G. S.; HERLICOVIEZ, D.; WHALEN, R. G. Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. **FEBS Lett**, v. 166, n. 1, p. 71-75, Jan 23 1984.

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. **Nutr Neurosci**, p. 1-12, Jul 28 2017.

CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 24, p. 321-361, 1996.

CAIOZZO, V. J. et al. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 4, p. C709-717, Apr 2000.

CHECHI, K.; CHEEMA, S. K. Maternal diet rich in saturated fats has deleterious effects on plasma lipids of mice. **Exp Clin Cardiol**, v. 11, n. 2, p. 129-135, Summer 2006.

CHEN, Y. et al. The Effect of High Fat Diet on Secreted Milk Transcriptome in Mid-lactation Mice. **Physiol Genomics**, p. physiolgenomics 00080 02017, Nov 1 2017.

CHENG, S. Y. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 1, n. 1-2, p. 9-18, Jan 2000.

CHRIST, B.; ORDAHL, C. P. Early stages of chick somite development. **Anat Embryol (Berl)**, v. 191, n. 5, p. 381-396, May 1995.

- CLARK, B. A. et al. Effect of diet-induced obesity and metabolic syndrome on skeletal muscles of Ossabaw miniature swine. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 5, p. E848-857, May 2011.
- CONDON, K. et al. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. **Dev Biol**, v. 138, n. 2, p. 256-274, Apr 1990.
- DA SILVA ARAGAO, R. et al. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 1, p. 70-83, Jan 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, 2008.
- DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000-1007, Dec 1981.
- DEL PRADO, M.; DELGADO, G.; VILLALPANDO, S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. **J Nutr**, v. 127, n. 3, p. 458-462, Mar 1997.
- DESAI, M. et al. Rat Maternal Obesity and High Fat Diet Program Offspring Metabolic Syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211, n. 3, p. 237.e231-237.e213, Sep 2014.
- DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 159, p. 503-509, Feb 18 1964.
- DOERFLINGER, A.; SWITHERS, S. E. Effects of diet and handling on initiation of independent ingestion in rats. **Dev Psychobiol**, v. 45, n. 2, p. 72-82, Sep 2004.
- EDGERTON, V. R.; ROY, R. R. Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. **J Biomech**, v. 24 Suppl 1, p. 123-133, 1991.
- EHRENBORG, E.; KROOK, A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 3, p. 373-393, Sep 2009.
- ESHIMA, H. et al. Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. **Physiol Rep**, v. 5, n. 7, Apr 2017.
- FEINBERG, A. P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature**, v. 447, p. 433-440, 2007.
- FERRUCCI, L. et al. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 12, p. 1947-1954, Dec 2002.
- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, Feb 14 2013.
- FLOCH, J.-P. L. et al. Blood Glucose Area Under the Curve: Methodological Aspects. **Diabetes Care**, v. 13, n. 2, p. 172, 1990.

FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4312-4317, Apr 29 1997.

FRONTERA, W. R.; ZAYAS, A. R.; RODRIGUEZ, N. Aging of human muscle: understanding sarcopenia at the single muscle cell level. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 23, n. 1, p. 201-207, xiii, Feb 2012.

GALGANI, J. E.; MORO, C.; RAVUSSIN, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 5, p. E1009-1017, Nov 2008.

GAN, Z. et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2564-2575, 06/03/ 2013.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; SPENCER, H. G. Predictive adaptive responses and human evolution. **Trends Ecol Evol**, v. 20, n. 10, p. 527-533, Oct 2005.

GODARA, R.; KAUR, A. P.; BHAT, C. M. Effect of cellulose incorporation in a low fiber diet on fecal excretion and serum levels of calcium, phosphorus, and iron in adolescent girls. **Am J Clin Nutr**, v. 34, n. 6, p. 1083-1086, Jun 1981.

GOODMAN, M. N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 205, n. 2, p. 182-185, Feb 1994.

GREFTE, S. et al. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem Cells Dev**, v. 16, n. 5, p. 857-868, Oct 2007.

GREGORIO, B. M. et al. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 2, p. 759-769, Mar 2013.

GUO, F.; JEN, K. L. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiol Behav**, v. 57, n. 4, p. 681-686, Apr 1995.

GURRIARAN-RODRIGUEZ, U. et al. The obestatin/GPR39 system is up-regulated by muscle injury and functions as an autocrine regenerative system. **J Biol Chem**, v. 287, n. 45, p. 38379-38389, Nov 2 2012.

GURRIARAN-RODRIGUEZ, U. et al. Action of obestatin in skeletal muscle repair: stem cell expansion, muscle growth, and microenvironment remodeling. **Mol Ther**, v. 23, n. 6, p. 1003-1021, Jun 2015.

GUSTAFSON, T. A.; MARKHAM, B. E.; MORKIN, E. Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. **Circ Res**, v. 59, n. 2, p. 194-201, Aug 1986.

HADDAD, F. et al. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E1018-1026, Jun 1998.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HAN, D. S.; YANG, W. S.; KAO, T. W. Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. **Int J Med Sci**, v. 14, n. 5, p. 434-443, 2017.

- HANCOCK, C. R. et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 22, p. 7815-7820, Jun 3 2008.
- HARRIDGE, S. D. R. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 783-797, 2007.
- HASTY, P. et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v. 364, n. 6437, p. 501-506, Aug 05 1993.
- HEGARTY, B. D. et al. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. **Acta Physiol Scand**, v. 178, n. 4, p. 373-383, Aug 2003.
- 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 Obstet Gynecol Scand**, v. 93, n. 11, p. 1170-1180, Nov 2014.
- HO, K. W. et al. Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. **J Embryol Exp Morphol**, v. 76, p. 37-49, Aug 1983.
- HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, n. 3886, p. 1356-1365, Jun 20 1969.
- JACOB, P. S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell Biochem Funct**, v. 31, n. 3, p. 244-253, Apr 2013.
- JENSEN, R. G. Lipids in human milk. **Lipids**, v. 34, n. 12, p. 1243-1271, Dec 1999.
- KANNISTO, K. et al. Differential expression of peroxisomal proliferator activated receptors alpha and delta in skeletal muscle in response to changes in diet and exercise. **Int J Mol Med**, v. 17, n. 1, p. 45-52, Jan 2006.
- KARDON, G.; CAMPBELL, J. K.; TABIN, C. J. Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. **Dev Cell**, v. 3, n. 4, p. 533-545, Oct 2002.
- KASSAR-DUCHOSSOY, L. et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 466-471, Sep 23 2004.
- KLEINER, S. et al. PPAR{delta} agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1{alpha} but does not increase mitochondrial gene expression and function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 28, p. 18624-18633, Jul 10 2009.
- KRUSE, M. et al. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 10, p. 3565-3576, Oct 2013.
- KUO, T.; HARRIS, C. A.; WANG, J. C. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. **Mol Cell Endocrinol**, v. 380, n. 1-2, p. 79-88, Nov 5 2013.
- LAFRAMBOISE, W. A. et al. Electrophoretic separation and immunological identification of type 2X myosin heavy chain in rat skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1035, n. 1, p. 109-112, Jul 20 1990.

- LAPSYS, N. M. et al. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 11, p. 4293-4297, Nov 2000.
- LARSSON, L. et al. Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. **J Physiol**, v. 481 (Pt 1), p. 149-161, Nov 15 1994.
- LEE, C. H.; OLSON, P.; EVANS, R. M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2201-2207, Jun 2003.
- LEE, J. W.; KIM, N. H.; MILANESI, A. Thyroid Hormone Signaling in Muscle Development, Repair and Metabolism. **J Endocrinol Diabetes Obes**, v. 2, n. 3, p. 1046, Jul-Sep 2014.
- LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 61-86, 2004.
- LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797-801, Aug 15 2002.
- LOWEY, S. et al. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **J Mol Biol**, v. 42, n. 1, p. 1-29, May 28 1969.
- LUNDBAEK. INTRAVENOUS GLUCOSE TOLERANCE TEST. **Acta Medica Scandinavica**, v. 171, n. S375, p. 47-59, 1962.
- MA, K. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 2, p. E363-371, Aug 2003.
- MACPHERSON, R. E. K. et al. A Maternal High Fat Diet Has Long-Lasting Effects on Skeletal Muscle Lipid and PLIN Protein Content in Rat Offspring at Young Adulthood. **Lipids** v. 50, p. 205–217 2015.
- MAIA, A. L. et al. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. **J Endocrinol**, v. 209, n. 3, p. 283-297, Jun 2011.
- MALLINSON, J. E. et al. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. **Br J Nutr**, v. 98, n. 2, p. 292-299, Aug 2007.
- MARCO, A. et al. Overweight and CpG methylation of the Pomc promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not “reprogrammed” by regular chow diet in rats. **Faseb j**, v. 28, n. 9, p. 4148-4157, Sep 2014.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, Nov 2002.
- MASUYAMA, H.; HIRAMATSU, Y. Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2823-2830, Jun 2012.
- MATSAKAS, A.; PATEL, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. **Histol Histopathol**, v. 24, n. 5, p. 611-629, May 2009.

- MAVALLI, M. D. et al. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 4007-4020, Nov 2010.
- MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-483, Jun 2002.
- MUSCAT, G. E. et al. Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 4, p. 583-591, Feb 25 1994.
- NASSARI, S.; DUPREZ, D.; FOURNIER-THIBAUT, C. Non-myogenic Contribution to Muscle Development and Homeostasis: The Role of Connective Tissues. **Front Cell Dev Biol**, v. 5, p. 22, 2017.
- NOVAK, P.; ZACHAROVA, G.; SOUKUP, T. Individual, age and sex differences in fiber type composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat strains. **Physiol Res**, v. 59, n. 5, p. 783-801, 2010.
- NOVELLI, E. L. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v. 41, n. 1, p. 111-119, Jan 2007.
- NYHOLM, B. et al. Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1822-1828, Nov 1997.
- ODAKA, Y. et al. The influence of a high-fat dietary environment in the fetal period on postnatal metabolic and immune function. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 9, p. 1688-1694, Sep 2010.
- ONTELL, M.; BOURKE, D.; HUGHES, D. Cytoarchitecture of the fetal murine soleus muscle. **Am J Anat**, v. 181, n. 3, p. 267-278, Mar 1988.
- OSTLUND, I.; HAGLUND, B.; HANSON, U. Gestational diabetes and preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 113, n. 1, p. 12-16, Mar 15 2004.
- PANTALEAO, L. C. et al. Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 7, p. 1340-1348, Jul 2013.
- PARTRIDGE, T. A. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4177-4186, Sep 2013.
- PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8466-8471, Jul 8 2003.
- PEREIRA, R. M. R.; FREIRE DE CARVALHO, J. Glucocorticoid-induced myopathy. **Joint Bone Spine**, v. 78, n. 1, p. 41-44, 2011/01/01/ 2011.
- PILEGGI, C. A. et al. Maternal High Fat Diet Alters Skeletal Muscle Mitochondrial Catalytic Activity in Adult Male Rat Offspring. **Front Physiol**, v. 7, 2016a.

PILEGGI, C. A. et al. Maternal conjugated linoleic acid supplementation reverses high-fat diet-induced skeletal muscle atrophy and inflammation in adult male rat offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 310, n. 5, p. R432-439, Mar 1 2016b.

PRESCOD, A. L. V.; HALLIDAY, W. C.; TAYLOR, C. G. Protein deficiency, but not zinc deficiency, reduces recovery of type 1 and type 2 muscle fibre diameters in the gastrocnemius muscle of growing rats. **British Journal of Nutrition**, n. 106, p. 675-682 2011.

PROUD, C. G. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 2, p. 429-436, Jan 09 2004.

PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. **Acta Histochem**, v. 106, n. 2, p. 145-154, 2004.

PURCELL, R. H. et al. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. **Physiol Behav**, v. 104, n. 3, p. 474-479, Sep 1 2011.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 7, p. 349-353, Aug 12 1976.

RAYNE, J.; CRAWFORD, G. N. Increase in fibre numbers of the rat pterygoid muscles during postnatal growth. **J Anat**, v. 119, n. Pt 2, p. 347-357, Apr 1975.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

RELAIX, F. et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. **J Cell Biol**, v. 172, n. 1, p. 91-102, Jan 02 2006.

RIEUSSET, J. et al. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. **Diabetes**, v. 48, n. 4, p. 699-705, Apr 1999.

RISSE, V. et al. Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. **J Cell Biol**, v. 187, n. 6, p. 859-874, Dec 14 2009.

ROSSI, G.; MESSINA, G. Comparative myogenesis in teleosts and mammals. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 16, p. 3081-3099, Aug 2014.

RUDNICKI, M. A. et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351-1359, Dec 31 1993.

SAMUELSSON, A. M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 383-392, Feb 2008.

SANTOS-ZAS, I. et al. Obestatin controls skeletal muscle fiber-type determination. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2137, 2017/05/18 2017.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **Febs j**, v. 280, n. 17, p. 4294-4314, Sep 2013.

- SCHIAFFINO, S.; HANZLIKOVA, V.; PIEROBON, S. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. **J Cell Biol**, v. 47, n. 1, p. 107-119, Oct 1970.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, Oct 2011.
- SCHULZE, P. C. et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. **Basic Res Cardiol**, v. 98, n. 4, p. 267-274, Jul 2003.
- SEALE, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 777-786, Sep 15 2000.
- SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 6, p. 624-630, Jun 2013.
- SHAO, S. et al. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 35, n. 11, p. 1411-1420, Nov 2014.
- SHARPLES, A. P.; STEWART, C. E.; SEABORNE, R. A. Does skeletal muscle have an 'epi'-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. **Aging Cell**, v. 15, n. 4, p. 603-616, Aug 2016.
- SHELLEY, P. et al. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 3, p. R675-681, Sep 2009.
- SHORTREED, K. E. et al. Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7293, Oct 06 2009.
- SILVEIRA, L. R. et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 1-12, 2008.
- SIMAR, D. et al. Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 22, n. 3, p. 269-276, Mar 2012.
- SIMONEAU, J. A.; BOUCHARD, C. Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. **Faseb j**, v. 9, n. 11, p. 1091-1095, Aug 1995.
- SLUPECKA, M.; ROMANOWICZ, K.; WOLINSKI, J. Maternal High-Fat Diet during Pregnancy and Lactation Influences Obestatin and Ghrelin Concentrations in Milk and Plasma of Wistar Rat Dams and Their Offspring. **Int J Endocrinol**, v. 2016, p. 5739763, 2016.
- SMERDU, V. et al. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 267, n. 6 Pt 1, p. C1723-1728, Dec 1994.
- STANFORD, K. I. et al. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 427-433, Feb 2015.

- STARON, R. S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 117-123, Feb 1999.
- SUTER, M. A. et al. Maternal high-fat diet modulates the fetal thyroid axis and thyroid gene expression in a nonhuman primate model. **Mol Endocrinol**, v. 26, n. 12, p. 2071-2080, Dec 2012.
- TAJBAKSH, S.; BUCKINGHAM, M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. **Curr Top Dev Biol**, v. 48, p. 225-268, 2000.
- TAJBAKSH, S.; ROCANCOURT, D.; BUCKINGHAM, M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. **Nature**, v. 384, n. 6606, p. 266-270, Nov 21 1996.
- TAJBAKSH, S. et al. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. **Cell**, v. 89, n. 1, p. 127-138, Apr 04 1997.
- TAMASHIRO, K. L. K. et al. Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1116-1125, 2009.
- TANNER, C. J. et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 6, p. E1191-1196, Jun 2002a.
- TANNER, C. J. et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 282, p. E1191–E1196, 2002b.
- TE PAS, M. F.; DE JONG, P. R.; VERBURG, F. J. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. **Mol Biol Rep**, v. 27, n. 2, p. 87-98, Jun 2000.
- TOKUNAGA, M. et al. Nutrition and Epigenetics. **Medical Epigenetics**, v. 1, n. 1, p. 70-77, 2013.
- TONG, J. F. et al. Maternal obesity downregulates myogenesis and beta-catenin signaling in fetal skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E917-924, Apr 2009.
- 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, Aug 2007.
- VON MALTZAHN, J. et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 41, p. 16474-16479, Oct 08 2013.
- WANG, Y.-X. et al. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR δ . **PLOS Biology**, v. 2, n. 10, p. e294, 2004a.
- WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e294, Oct 2004b.
- WELLS, J. C. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **Am J Hum Biol**, v. 22, n. 1, p. 1-17, Jan-Feb 2010.
- WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.

- WHITE, P.; DAUNCEY, M. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 2, p. 241-254, October 1, 1999 1999.
- WHITE, R. B. et al. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. **BMC Dev Biol**, v. 10, p. 21, Feb 22 2010.
- WILSON, S. J.; ROSS, J. J.; HARRIS, A. J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development**, v. 102, n. 4, p. 815-821, Apr 1988.
- YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 23-67, Jan 2013.
- YU, F. et al. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 6, p. R1545-1554, Jun 2000.
- ZAMMIT, P. S. et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? **J Cell Biol**, v. 166, n. 3, p. 347-357, Aug 02 2004.
- ZHU, M. J. et al. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J Physiol**, v. 575, n. Pt 1, p. 241-250, Aug 15 2006.
- ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e348, Oct 2004.
- ZIMMERS, T. A. et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, v. 296, n. 5572, p. 1486-1488, May 24 2002.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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, 04 de setembro de 2015

Ofício nº 82/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.º Raul Manhaes de Castro
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.024643/2015-55

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "**Dieta hiperlipídica materna: Repercussões sobre a plasticidade fenotípica, comportamento motor e a flexibilidade metabólica muscular da prole de ratos**".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição; Animal Rato heterogênico; Linhagem; Wistar; idade; 60 dias; peso; 200-250g; Nº total de animais a ser utilizado; 218.

Atenciosamente,

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