

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

JOSÉ ANTONIO DOS SANTOS

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO DE RESISTÊNCIA
SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTÉICA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Recife, 2015

JOSÉ ANTONIO DOS SANTOS

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO DE RESISTÊNCIA
SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTÉICA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadores:

Dra. Carol Virgínia Góis Leandro

Dr. Raul Manhães de Castro

Recife, 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237e Santos, José Antonio dos.

Efeitos do treinamento físico de resistência sobre a atividade locomotora de ratos adultos submetidos à dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação / José Antonio dos Santos. – Recife: O autor, 2015.

82 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Carol Virgínia Góis Leandro.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.

Inclui referências e anexos.

1. Força. 2. Treinamento de resistência. 3. Atividade locomotora. 4. Dieta hipoproteica. 5. Plasticidade fenotípica. I. Leandro, Carol Virgínia Góis (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-219)

José Antonio dos Santos

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO DE RESISTÊNCIA SOBRE A
ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
DIETA HIPOPROTÉICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Tese aprovada em 11 de novembro de 2015 pela banca:

Prof. Dra. Carol Virgínia Góis Leandro, CAV/UFPE.

Prof. Dra. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz, UFPE

Prof. Dr. Marcos André Moura dos Santos, UPE

Prof. Dr. Marcelus Brito de Almeida, CAV/UFPE

Prof. Dra. Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff, CAV/UFPE

Recife, 2015

A Lista

Compositor: Oswaldo Montenegro

“Faça uma lista de grandes amigos
Quem você mais via há dez anos atrás
Quantos você ainda vê todo dia
Quantos você já não encontra mais...
Faça uma lista dos sonhos que tinha
Quantos você desistiu de sonhar!
Quantos amores jurados pra sempre
Quantos você conseguiu preservar...
Onde você ainda se reconhece
Na foto passada ou no espelho de agora?
Hoje é do jeito que achou que seria
Quantos amigos você jogou fora?
Quantos mistérios que você sondava
Quantos você conseguiu entender?
Quantos segredos que você guardava
Hoje são bobos, ninguém quer saber?
Quantas mentiras você condenava?
Quantas você teve que cometer?
Quantos defeitos sanados com o tempo
Eram o melhor que havia em você?
Quantas canções que você não cantava
Hoje assobia pra sobreviver?
Quantas pessoas que você amava
Hoje acredita que amam você?”

**“Dedico esta tese àquele com quem converso em silêncio todos os
dias e que sempre estará comigo”**

Agradecimentos

A **Deus** não há palavras para expressar esse agradecimento. Fecho apenas os meus olhos e agradeço em silêncio, pois há um pedaço dele dentro de cada um de nós.

A **Raquel Aragão** “L'amour guérit tout“. Compartilharemos muitos momentos felizes minha noiva e eterna amiga.

Aos meus pais **Ivanice Maria** (Dona Nena) e **José Manoel** (Seu Zé) por me ensinarem o verdadeiro significado da vida. Tenho orgulho das minhas raízes, são meus exemplos de luta e dedicação aos filhos. Meu porto seguro sempre!

Aos meus irmãos **Cristiane, Ronaldo, Romário e Betânia** pelo apoio de sempre.

As minhas alunas de iniciação científica e amigas **Thaynan e Elayne** parte dessa tese pertence a vocês. Agradeço pela dedicação e companheirismo sempre. Vocês encheram o trabalho de alegria.

Aos meus tios **Nice e Pequeno** e aos meus primos **Fábio e Fabíola**, por sempre me receberem de braços abertos.

Aos meus amigos que, mesmo por vezes distantes, estavam presentes em mais esta etapa. Tentei escrever o nome de cada um de vocês, mas não coube aqui, então guardei seus nomes em meu coração. Amigo de verdade é aquele que não importa quanto tempo passaram distantes e sim aqueles que quando se reencontram, não parece que estiveram longe. Espero estar ao lado de vocês sempre.

Ao **Dr. Edeones França** pelo apoio e conversas que me ajudavam a não baixar a cabeça nunca.

Aos meus orientadores **Carol Leandro e Raul Manhães** por me ensinarem o significado da palavra **Resiliência** e por estarem comigo sempre. Uma etapa concluída não é o fim! Cada etapa concluída é o começo de um novo ciclo. Os desafios da vida nos mantém vivos!

Invictus

William Ernest Henley

Dentro da noite que me rodeia
Negra como um poço de lado a lado
Agradeço ao deus que existe
Por minha alma indomável
Sob as garras cruéis das circunstâncias
Eu não tremo e nem me desespero
Sob os duros golpes do acaso
Minha cabeça sangra, mas continua erguida
Mais além deste lugar de lágrimas e ira,
Jazem os horrores da sombra.
Mas a ameaça dos anos,
Me encontra e me encontrará, sem medo.
Não importa quão estreito o portão
Quão repleta de castigo a sentença,
Eu sou o senhor de meu destino
Eu sou o capitão de minha alma.

“Viva, como se fosse morrer amanhã.

Aprenda, como se fosse viver para sempre.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O objetivo do primeiro estudo foi avaliar os efeitos do treinamento de resistência sobre a morfologia muscular e sobre a expressão gênica de fatores neurotróficos no sistema nervoso central. Foram utilizados 31 ratos machos Wistar (65 ± 5 dias de vida). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Não-Treinado (NT, $n=13$) e treinado (T, $n=18$). Animais do grupo T foram submetidos a um protocolo de treinamento físico de resistência diário, 5 dias por semana, durante 8 semanas, com 80% da sobrecarga máxima individual acessada semanalmente. O sacrifício foi realizado 48 horas após a última sessão de treinamento e os tecidos removidos e congelados imediatamente. Foi avaliada a histologia dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL), $n=6$ por grupo) através da técnica da ATPase miofibrilar. Para análise da expressão gênica ($n=5$ por grupo) de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) no córtex motor, medula espinal e cerebelo foi utilizada a técnica do PCR em tempo real. No Músculo EDL, Animais T apresentaram um aumento na proporção de fibras tipo IIb e redução de fibras tipo IIa. Expressão de genes para IGF-1 foi reduzida no cerebelo de animais T. O objetivo do segundo estudo foi avaliar os efeitos do treinamento de resistência diário na atividade locomotora (LA) em animais desnutridos no período perinatal. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta da mãe durante a gestação e lactação: controle (17% de caseína, C) e hipoproteica (8% de caseína, LP). Aos 60 dias, metade de cada grupo foi submetido a um treinamento de resistência (subida em escada, 5 dias/semana, durante 8 semanas, com 80% de sobrecarga máxima avaliada semanalmente, T e LP+T). Para a análise da LA, os ratos foram filmados antes e após 8 semanas de treinamento em campo aberto e as imagens foram analisadas pelo software para análise automática de atividade locomotora. Este software fornece: distância percorrida (metros); distância rotacional (metros); velocidade média (m/s); velocidade máxima (m/s); potência média (mW); tempo imóvel (s); número de paradas; tempo por parada (segundos). Após o treinamento, os filhotes T apresentaram menor potência média (C: $3,6 \pm 1,7$; T: $1,5 \pm 0,5$), número de paradas (C: $55,3 \pm 7,6$; T: $35,7 \pm 8,0$) e maior tempo por parada (C: $1,7 \pm 0,4$; T: $3,0 \pm 0,8$) quando comparado ao controle. Para filhotes LP+T, não houve diferenças em todas as variáveis quando comparados aos filhotes LP, com exceção da distância percorrida, que foi menor (LP: $12,5 \pm 2,7$; LP+T: $8,4 \pm 2,8$). Comparando os valores pós com os pré treinamento, filhotes LP+T, diferentemente do grupo LP, apresentam diminuição da distância percorrida (LP: pré= $14,3 \pm 3,5$; pós= $12,5 \pm 2,7$; LP+T: pré= $14,0 \pm 3,1$; pós= $8,4 \pm 2,8$). Em conclusão, nossos dados mostram que 8 semanas de treinamento de resistência diário foi suficiente para aumentar a capacidade de carregamento máxima e em aumentar a proporção de fibras musculares tipo IIb. O treinamento de resistência diário também altera a atividade locomotora tanto de animais controle quanto de animais desnutridos.

Palavras-chave: Força. Treinamento de resistência. Atividade locomotora. Dieta hipoproteica. Plasticidade fenotípica.

ABSTRACT

The objective of the first study was to evaluate the effects of a resistance training on the fiber type morphology and brain neurotrophic factors in young rats. Thirty-one male Wistar rats (65 ± 5 days old) were randomly divided in two groups: non-trained (NT, $n=13$) and trained (T, $n=18$). Animals from T group were submitted to a program of daily resistance training (5 days per week during 8 weeks) at 80% of individual maximum overload. This test was weekly performed to adjust the individual load throughout the weeks of training. After 48 hours from the last session of exercise, soleus and extensor digital longus (EDL) muscles were removed for myofibrillar ATPase staining analysis. Spinal cord, motor cortex and cerebellum were removed for real time RT-PCR analysis of BDNF and IGF-1 gene expression. In EDL muscle, T animals showed an increase in the proportion of type IIb fibers and a reduction of type IIa fibers. IGF-1 gene expression was reduced in the cerebellum of T animals (NT: 1.025 ± 0.12 ; T: 0.57 ± 0.11). The purpose of the second study was to evaluate the effects of daily resistance training on locomotor activity in undernourished animals during perinatal period. Male Wistar rats were divided into two groups according to their mother's diet during gestation and lactation: control (17% casein, C) and low-protein (8% casein, LP). On postnatal day 60, half of each group was submitted to daily resistance training (climb ladder, 5 days/week, during 8 weeks, with 80% of maximum overload weekly evaluated, T and LP+T) or not. To LA analyses the rats were filmed before and after 8 weeks of training on open field and the images were analyzed by the software for automatic analyze of locomotor activity. This software provides: distance traveled (meters); rotational distance (meters); average speed (m/s); maximum speed (m/s); average potency (mW); time immobile (s); number of stops; time/stop (seconds). After training, T pups showed a reduced average potency (C: 3.6 ± 1.7 ; T: 1.5 ± 0.5), number of stops (C: 55.3 ± 7.6 ; T: 35.7 ± 8.0) and high time/stop (C: 1.7 ± 0.4 ; T: 3.0 ± 0.8) when compared to control. For LP+T pups, there were no differences in all variables when compared to control and LP pups, except for distance traveled that was reduced when compared to LP pups (LP: 12.5 ± 2.7 ; LP+T: 8.4 ± 2.8). Compared post versus pre period of physical training, LP + T pups, different to LP group, present decreased distance traveled (LP: pre= 14.3 ± 3.5 ; post= 12.5 ± 2.7 ; LP+T: pre= 14.0 ± 3.1 ; post= 8.4 ± 2.8). In conclusion, our data show that 8 weeks of daily strength training was sufficient to increase the maximum loading capacity and increasing the proportion of muscle fiber type IIb. Daily resistance training also changes the locomotor activity of both control animals as of malnourished animals.

Key-words: Strength. Resistance training. Locomotor activity. Low protein diet. Phenotypic plasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Vista lateral do aparato de treinamento (escada com altura: 129 centímetros; largura: 20 cm; com 87 degraus e 1 cm entre os degraus) **(B)** Vista frontal do aparato de treinamento, pontos para colocar os ratos e **(C)** O suporte para a fixação da sobrecarga que consistia em um recipiente onde as cargas foram colocadas e uma fita de fixação **31**

Artigo 1

Figure 1. (A) Lateral view of the apparatus of training (height: 129cm; breadth: 20cm; size: 132cm; with 87 steps and 1 cm between the steps). **(B)** Frontal view of the apparatus of training, points for place the rats. **(C)** The support to attach the overload and the different loads; **(D)** Rat climbing the ladder with an overload fixed in its tail. **40**

Figure 2. Description of daily resistance training program. **41**

Figure 3. (A) Maximum overload, **(B)** percentage of the increase in maximum overload carried relative to the pre-training values in each groups, and **(C)** Units of overload (30 grams) carried by animals during the maximal overload test **44**

Figure 4. Images of the transverse sections (4x objective) *soleus* **(A)** and EDL **(B)** pre-incubated at pH 4.55 **45**

Figure 5. Relative expression of mRNA of BDNF in the spinal cord **(A)** motor cortex **(B)** and cerebellum **(C)** and relative expression of mRNA of IGF-1 in the spinal cord **(D)** motor cortex **(E)** e and cerebellum **(F)** **46**

Artigo 2

Figure 1. Body weight **(A)** and body weight gain **(B)** of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). **58**

Figure 2. Maximum overload capacity **(A)** and relative maximum overload capacity of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week **58**

Figure 3. Parameters of locomotor activity evaluated pre and post resistance training program. **60**

Figure 4. Pre and Pos mean values of parameters of average speed, maximum speed and average potency of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week) **61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos parâmetros de atividade locomotora que foram avaliadas no campo aberto.	34
Artigo 2	
Table 1. Description of the parameters of locomotor activity that were evaluated in the open field.	57
Table 2. Serum biochemistry and relative weights of organs of pups submitted to a resistance physical training	59
Table 3. Parameters of locomotor activity of pups submitted to a resistance physical training	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase	Enzima catalizadora do trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C	Grupo Controle
°C	Grau Celsius
CaMK	Proteína quinase dependente de Cálcio/Calmodulina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CREB	Proteína de ligação responsivo a cAMP
CT	Threshold cycle: número mínimo de ciclos para amplificação
EDL	Músculo extensor digital longo
EPM	Erro padrão da média
FHL	Músculo flexor longo do hálux
GH	Hormônio do crescimento
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
LA	Atividade locomotora
LP	Grupo Hipoprotéico
LP+T	Grupo Hipoprotéico treinado
MAPK	proteína-quinases ativadas por mitógenos
MHC	Cadeia Pesada de Miosina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NT	Grupo Não-Treinado
pH	Potencial Hidrogeniônico
RM	Repetição máxima
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
T	Grupo Treinado
VO_{2max}	Consumo Máximo de Oxigênio

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. HIPÓTESES	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. Animais do experimento 1	29
5.2. Animais do experimento 2	29
5.3. Programa de treinamento de resistência diário	30
5.4. Análise histoquímica muscular	32
5.5. Análise da expressão de genes através de PCR - Real time	32
5.6. Avaliação da atividade locomotora	33
5.7. Análise estatística	34
6. RESULTADOS	37
6.1. Resultados - Artigo original 1: Daily resistance physical training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurotrophic factors in young rats.	38
6.2. Resultados - Artigo original 2: Effects of daily resistance training on the locomotor activity in young rats submitted to a perinatal low-protein diet.	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	80
ANEXO A - Parecer do comitê de ética	80
ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo 1	81
ANEXO C - Comprovante de submissão do artigo 2	82

1. APRESENTAÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

Na área da ciência da atividade física, diversos programas de treinamento físicos têm sido utilizados para promover adaptações em curto e longo prazo no sistema neuromuscular. Dentre esses, o treinamento de resistência tem recebido bastante interesse. Treinamento de resistência é caracterizado pelo movimento dos segmentos corporais com a aplicação de uma sobrecarga aumentada de forma progressiva ao longo de um determinado período de tempo. Alguns programas de treinamento de resistência existentes para ratos podem não ser suficientes para induzir adaptações neuromusculares por simularem os programas com humanos, seguindo o mesmo número de sessões, intervalos, repetições e sobrecarga utilizada. Em humanos, o controle dessas variáveis é bem estabelecido, mas em modelos experimentais é difícil estabelecer o controle ideal das mesmas. Assim, a primeira dificuldade que se tem quando se trabalha com modelos experimentais é encontrar o controle adequado das variáveis do treinamento, levando em consideração o princípio da individualidade biológica. Tal dificuldade torna necessária uma adaptação no aparato utilizado e no programa de treinamento visando uma melhor resposta comportamental ao treinamento.

Um dos objetivos relacionado ao treinamento de resistência é o ganho de força, o qual pode estar diretamente relacionado com o ganho de massa muscular e com a transição do tipo de fibra. Além disso, acredita-se que fatores neurais também possam estar influenciando tanto o ganho de força, quanto o aumento da massa muscular e a transição dos tipos de fibras. Em outros modelos de treinamento físico, foram observados melhoras nas funções cerebrais relacionadas com neurogênese, angiogênese, sinaptogênese e aumento na liberação de fatores de crescimento tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1). Pouco é conhecido a respeito dos efeitos do treinamento de resistência na expressão de IGF-1 e BDNF no córtex motor, medula espinal e cerebelo, estruturas cerebrais relacionadas ao controle dos movimentos e coordenação. Dessa forma, um dos objetivos do presente estudo foi validar um programa de treinamento de resistência, capaz de melhorar o desempenho durante as sessões de exercício, induzir adaptações na proporção de fibras musculares e alterar a expressão de fatores neurotróficos tais como BDNF e IGF-1, em ratos.

A atividade locomotora é uma série de movimentos que permitem ao indivíduo se transportar de um espaço a outro. A atividade locomotora é um importante componente da exploração e atividades espontâneas envolvidas em diversas respostas comportamentais e

fisiológicas. Habilidades motoras fundamentais são construídas durante a infância e são essenciais para a integração dos sistemas nervoso e muscular, formando a base de movimentos necessários posteriormente. Nesse contexto, os períodos iniciais de crescimento e desenvolvimento são considerados períodos vulneráveis e mais susceptíveis a estímulos ambientais, tais como a desnutrição, e podem repercutir no processo de saúde e doença do indivíduo na idade adulta. Dessa forma, a desnutrição perinatal pode causar prejuízos nas fases de desenvolvimento da atividade locomotora.

O termo “plasticidade do desenvolvimento” é usado para explicar que durante a ontogênese precoce, o organismo passa a desenvolver “janelas críticas” de sensibilidade ou plasticidade, durante o qual os fatores ambientais geram plasticidade fenotípica ou ajustes fenotípicos. Plasticidade fenotípica pode incluir plasticidade adaptativa na morfologia, fisiologia e comportamento ao longo de toda a vida, onde o indivíduo continua sendo susceptível a algumas adaptações ambientais tais como o treinamento físico.

Os períodos perinatais têm sido considerados períodos críticos por promoverem adaptações no sistema nervoso e muscular. Estas podem predispor a prole a alterações fenotípicas também na atividade locomotora. No entanto, o músculo esquelético é altamente plástico e se adapta as demandas ambientais através da regulação da composição das miofibras de contração lentas e rápidas. Algumas intervenções, incluindo exercícios de resistência podem induzir a transdiferenciação das fibras musculares e, potencialmente, a recuperação dos efeitos da desnutrição materna. Assim, nós também submetemos ratos a uma dieta hipoproteica durante a gestação e lactação. Posteriormente, os ratos foram submetidos a um programa de treinamento de resistência diário para testar a hipótese que o treinamento de resistência é um bom indutor de plasticidade fenotípica e capaz de reverter os efeitos em longo prazo da dieta hipoproteica perinatal sobre os padrões de atividade locomotora em ratos jovens.

O presente estudo foi realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, orientado pelos professores Carol Virgínia Góis Leandro e Raul Manhães de Castro. Os resultados compõem dois artigos originais, o primeiro apresentando os efeitos do treinamento de resistência sobre a morfologia de fibras musculares e expressão de fatores neurotróficos intitulado: *Daily resistance physical training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurothropic factors in young rats*. O segundo artigo apresenta os efeitos do treinamento de resistência sobre a atividade locomotora em animais submetidos a uma dieta

hipoproteica no período perinatal e é intitulado: *Daily resistance training alters the locomotor activity in young rats submitted to a perinatal low-protein diet*. O primeiro artigo foi submetido ao *European Journal of Applied Physiology* com fator de impacto 2.18. O segundo foi Submetido à revista *Nutritional Neuroscience* com fator de impacto 2.27.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Locomoção é a capacidade de um indivíduo interagir com seu ambiente apresentando um papel importante em parâmetros essenciais para a preservação da espécie, tais como interação social, busca pelo alimento e procriação (GEISLER *et al.*, 1993; GRAMSBERGEN, 1998; BOUET *et al.*, 2004; GARLAND *et al.*, 2011). A atividade locomotora é um comportamento complexo que representa, de forma simplificada, a interação entre os sistemas nervoso e muscular (GRAMSBERGEN *et al.*, 2001; GORSKA *et al.*, 2009). Ao contrário do conceito de locomoção, a atividade locomotora não é propriamente necessária para a sobrevivência ou homeostase, ou seja, não é motivada diretamente por fatores de preservação da espécie (alimentos, água ou procriação) (GARLAND *et al.*, 2011). Embora não diretamente motivada a atividade locomotora é alterada por alguns estímulos internos (morfologia muscular e desenvolvimento do sistema nervoso) e externos (lesão, nutrição ou exercício físico) (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990; GRAMSBERGEN *et al.*, 1999). Nesse sentido, os períodos iniciais de crescimento são bem estudados atualmente, por serem os períodos em que o organismo está mais susceptível a estímulos externos podendo ter efeitos irreversíveis (BARROS *et al.*, 2006; GORSKA *et al.*, 2009).

Os períodos iniciais de crescimento e desenvolvimento são conceituados como períodos críticos do desenvolvimento (MORGANE *et al.*, 2002). O conceito de períodos críticos permeia discussões sobre uma maior vulnerabilidade fisiológica, morfológica e comportamental relacionado com alguns insultos tais como a desnutrição (MORGANE *et al.*, 1993). A vulnerabilidade desse período sugere que processos de organização são instáveis a perturbações que podem retardá-los ou distorcê-los (MORGANE *et al.*, 1993). Dessa forma, todos os processos de desenvolvimento dos sistemas fisiológicos podem exibir períodos críticos cuja duração e importância dependerá das taxas de alterações que acontecem (MORGANE *et al.*, 1993). Entre os sistemas que podem sofrer com os estímulos nutricionais durante os períodos críticos, os sistemas muscular e nervoso têm recebido bastante atenção (DA-SILVA *et al.*, 1987; BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999; FREITAS-SILVA *et al.*, 2008).

O período crítico do músculo esquelético envolve tanto o período de gestação quanto o período de lactação (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Em ratos, o desenvolvimento de fibras primárias ocorre do 14º ao 16º dia de vida fetal e fibras secundárias entre 17º e 19º dia de vida fetal (WILSON *et al.*, 1988). A diferenciação em fibra de

contração lenta (tipo I) e fibra de contração rápida (tipo II) inicia na gestação e a diferenciação nos subtipos (IIa, IIb e IIc) ocorre ao longo do desenvolvimento (MALTIN *et al.*, 2001). Dessa forma, se um determinado estímulo ocorrer neste período pode induzir alteração tanto na massa muscular quanto na proporção de fibras musculares e consequentemente em parâmetros comportamentais que dependem diretamente destes dois sistemas (BARROS *et al.*, 2006; TOSCANO, MANHAES-DE-CASTRO, *et al.*, 2008).

O tecido muscular é altamente plástico e pode sofrer alterações morfofuncionais induzidas pela desnutrição (TOSCANO, MANHAES-DE-CASTRO, *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2011). Toscano *et al* (2008) e Leandro *et al* (2011) demonstraram que desnutrição proteica utilizando 8% de caseína induziu diminuição na proporção de fibras tipo I e aumento na proporção de fibras tipo II. Um dos mecanismos propostos para as adaptações morfofuncionais no músculo esquelético é sua própria inervação que pode estar alterada com a desnutrição (FREITAS-SILVA *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do sistema nervoso inicia durante a embriogênese e permanece ao longo do crescimento do organismo (MORGANE *et al.*, 1993). Durante a gestação as células neuronais migram para localizações distantes e inervam o órgão alvo (WANNER, GUERRA, *et al*, 2006). Os axônios motores em desenvolvimento se alongam até fazerem contato com a fibra muscular em desenvolvimento (WANNER, MAHONEY, *et al.*, 2006). Quando uma fibra muscular e um axônio se encontram, as principais mudanças consistem na interrupção do crescimento e na preparação da terminação nervosa para a liberação final da molécula neurotransmissora (TZARFATI-MAJAR *et al*, 2001). Além disso, podem ocorrer algumas modificações de fibras musculares no sítio de ligação, de modo que o estímulo possa ser recebido e se traduza em um estímulo contrátil (DOHERTY e WALSH, 1991). De tal modo, se a desnutrição acontecer nesse período pode causar tanto alterações musculoesqueléticas quanto comprometimentos no sistema nervoso, ressaltando sua interdependência funcional (FUNAKOSHI *et al*, 1995).

Diversos modelos de desnutrição perinatal podem causar danos no desenvolvimento do sistema nervoso e na atividade locomotora (MORGANE *et al.*, 2002; BARROS *et al et al.*, 2006; WAINWRIGHT e COLOMBO, 2006). Desnutrição utilizando dieta básica regional (DBR, 7,87% de proteína, 69,84% de carboidratos e 0,8% de lípidos), durante a gestação e lactação causou diminuição na velocidade de condução do nervo ciático (DA-SILVA *et al.*, 1987). Filhotes de ratas alimentadas, durante gestação e lactação, com 50% do consumo alimentar de animais controle, apresentam menor diâmetro e mielinização do nervo ciático

(SEGURA *et al.*, 2004). Desnutrição proteica (utilizando caseína 8%) durante a lactação levou a uma diminuição na excitabilidade reflexa em ratos aos 21, 40 e 60 dias de vida (FREITAS-SILVA *et al.*, 2008). Em resposta a DBR, dieta neonatal multi-deficiente, observou-se um atraso no desenvolvimento do sistema nervoso e uma redução da distância percorrida no teste de atividade locomotora no qual os filhotes foram colocados em uma plataforma quadrada de madeira durante 1 minuto (BARROS *et al.*, 2006). Gramsbergen e Westerga (1992) mostraram que ratos desnutridos com dieta restrita a 40% da ingestão alimentar normal, submetidos ao teste de atividade locomotora aos 30 dias de idade, colocados livremente em uma pista de acrílico alongada durante 15 minutos, apresentam menor velocidade e distância percorrida que os animais controle (GRAMSBERGEN e WESTERGA, 1992).

Outro estímulo que pode induzir alterações morfofuncionais tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico, a depender da intensidade, duração, frequência e tipo, é o exercício físico (GOLDSHMIT *et al.*, 2008; ILHA *et al.*, 2008). No sistema nervoso periférico, em animais submetidos à lesão no nervo ciático, corrida em esteira, durante 5 semanas, 5 dias por semana, 20 a 60 min/dia, 30% a 55% da velocidade máxima, levou a recuperação na mielinização do nervo ciático (ILHA *et al.*, 2008). Animais submetidos a 5 semanas de treinamento físico, composto por corrida em esteira, 6-12 m/min, 5 dias/semana e que foram submetidos a hemiseção da coluna, apresentaram diminuição da atrofia muscular e aumento na concentração de marcadores sinápticos como sinaptofisina (GOLDSHMIT *et al.*, 2008).

Um dos mecanismos propostos para as alterações morfofuncionais no sistema neuromuscular, induzidas pelo exercício físico, é um aumento na liberação de fatores de crescimento tais como fator de crescimento similar à insulina (IGF-1), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4) (THOENEN, 1991). Estes fatores são importantes para o crescimento e diferenciação do motoneurônio e são aumentados no sistema nervoso após o exercício físico (ILHA *et al.*, 2008). O IGF-1 e IGF-2 têm sido mostrados como estimuladores da regeneração do nervo ciático em ratos (PU *et al.*, 1995). A concentração de IGF-1 no encéfalo foi aumentada após uma sessão de corrida em esteira durante 1 hora a 17 m/min (CARRO *et al.*, 2000). Em um estudo com ratos, Neeper *et al.* (1996) observaram que a atividade física (corrida voluntária em ciclo-ergômetro durante 7 dias) pode aumentar a concentração de RNAm para BDNF no hipocampo imediatamente após a atividade física (NEEPER *et al.*, 1996). Em um estudo com humanos,

Seifert *et al* (2010) observaram que corrida em bicicleta 60min/dia a 65% do VO₂max, aumenta a liberação de BDNF no encéfalo logo após a última sessão de treinamento.

Outro tipo de treinamento físico que tem recebido bastante interesse é o treinamento de resistência (CAMPOS *et al.*, 2002; KRAEMER *et al.*, 2007; HOLM *et al.*, 2008). Treinamento de resistência é um tipo de exercício caracterizado pela aplicação de uma sobrecarga progressiva ao corpo ou segmento corporal (KRAEMER *et al.*, 2002; HOLM *et al.*, 2008). Este tipo de exercício causa hipertrofia muscular e aumento da excitabilidade neural periférica, parâmetros que podem influenciar a locomoção do animal (AAGAARD *et al.*, 2002; HORNBERGER e FARRAR, 2004). Duncan *et al* (1998) submeteram ratos a um período de 26 semanas de subida em escada (com um aumento gradual da sobrecarga presa na cauda) e observaram um aumento da força e aumento da massa dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) (DUNCAN *et al.*, 1998). Por sua vez, Hornberger e Farrar (2004), usando um protocolo de treinamento de resistência semelhante (subida em escada, 3 vezes por semana, com 50%, 75%, 90% e 100% da sobrecarga máxima), observou-se que apenas oito semanas de treinamento foi suficiente para aumentar a força e causar hipertrofia no músculo flexor longo do hálux (FHL).

Além de estar relacionada com a área transversa do músculo, a força também tem correlação com o tipo de fibra muscular (FINER *et al.*, 1994; TRAPPE *et al.*, 2003). A produção de força é maior em fibras musculares tipo IIb e IIa que em fibras tipo I (BOTTINELLI *et al.*, 1996). Fibras musculares tipo I (oxidativas) são mais resistentes para a produção de movimentos que exigem maior menor produção de força, mas com longa duração, que são necessárias para a manutenção do controle da postura (BOTTINELLI *et al.*, 1996; KERNELL, 2003). Fibras musculares tipo IIb (glicolíticas) e IIa (oxidativas-glicolíticas) são recrutadas para a produção de movimentos rápidos e fortes necessários no treinamento de resistência (TRAPPE *et al.*, 2003; GRIFFIN e CAFARELLI, 2005). O treinamento de resistência pode levar a adaptações no tipo de fibra muscular a depender da intensidade do estímulo (CAMPOS *et al.*, 2002; HORNBERGER e FARRAR, 2004; LEANDRO *et al.*, 2011). Em humanos, treinamento de resistência com 9 a 11 repetições com 60% de 1RM, 3 vezes por semana durante 8 semanas, aumentou a proporção de fibras tipo IIa e diminuiu a proporção de fibras tipo IIb (CAMPOS *et al.*, 2002)). Roy *et al* (1997) submeteram ratos a um protocolo de treinamento de resistência de levantamento de peso, 3 sessões por semana, durante 8 semanas e não observaram alterações na proporção entre fibras tipo I e II no músculo adutor longo. Hornberger e Farrar (2004) analisaram a composição da

cadeia pesada de miosina (MHC) do músculo Flexor longo do hálux FHL de animais submetidos a um treinamento de resistência em escada por oito semanas e não observaram alterações na proporção dos tipos de fibras. Por outro lado, Lee *et al* (1999) utilizando o mesmo protocolo de treinamento e o mesmo músculo, observaram um aumento na proporção de MHCIIa (LEE *et al.*, 1999). Embora os resultados sejam controversos, parece haver uma maior facilidade das fibras tipo IIa e IIb em alterarem seu fenótipo (LEE *et al.*, 1999; CAMPOS *et al.*, 2002).

Desnutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento pode levar a adaptações no sistema musculoesquelético e no sistema nervoso. Além disso, o desenvolvimento da atividade locomotora parece ser comprometido pela desnutrição. Acreditamos que problemas no desenvolvimento da atividade locomotora possui uma ligação com as alterações no desenvolvimento de estruturas musculares e neurais provocadas pela desnutrição. O treinamento físico é capaz de provocar algumas adaptações contrárias às provocadas pela desnutrição sobre o músculo esquelético. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos do treinamento físico sobre a atividade locomotora em animais desnutridos. O treinamento de resistência, além de atenuar os efeitos da desnutrição sobre o sistema nervoso e muscular, pode também atenuar os efeitos da dieta hipoproteica sobre a atividade locomotora de ratos adultos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Validar um protocolo de treinamento de resistência e avaliar seus efeitos sobre a morfologia de fibras musculares, sobre a expressão gênica de fatores neurotróficos no sistema nervoso central em ratos normonutridos e sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal.

3.2. Específicos:

- Validar um programa de treinamento de resistência diário;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico de resistência sobre a proporção de fibras musculares (tipo I, IIa e IIb) nos músculos sóleo e EDL em ratos normonutridos;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico de resistência sobre a expressão de BDNF e IGF no córtex motor, medula espinal e cerebelo em ratos normonutridos;
- Em animais submetidos a uma dieta hipoproteica perinatal, avaliar os efeitos do treinamento físico de resistência sobre a atividade locomotora.

4. HIPÓTESES

4. HIPÓTESES

O treinamento físico de resistência diário aumenta a proporção de fibras musculares tipo II e subtipo IIa. Além disso, aumenta a expressão de genes para BDNF e IGF-1 no córtex motor, na medula espinal e no cerebelo. Em animais submetidos à desnutrição perinatal o treinamento de resistência melhora os padrões de atividade locomotora.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo número: 23076.042017/2013-89) e seguiu as recomendações para o cuidado e uso de animais de laboratório (BAYNE, 1996).

Animais experimento 1

Foram utilizados 31 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* 60 dias de idade, peso corporal 270 – 280 g). Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas e receberam água e ração padrão (52% carboidrato, 21% proteína e 4% de lipídeo) *ad libitum*. Foram separados aleatoriamente em dois grupos: não-treinado (NT, n=13) e treinado (T, n=18). Os animais treinados foram submetidos a um programa de treinamento de resistência como descrito adiante. O peso corporal foi registrado semanalmente durante todo o programa de treinamento. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os ratos foram decaptados e os músculos sóleo e EDL foram removidos para análise. A medula espinal, córtex motor e cerebelo foram coletados para a análise da expressão de genes para BDNF e IGF-1.

Animais experimento 2

Foram utilizadas doze ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, 12 semanas de idade). As fêmeas foram colocadas para acasalar (2 fêmeas para 1 macho) durante um período de 2 a 4 dias. Foi realizado um controle para que cada macho acasalasse no máximo com duas fêmeas. O dia em que os espermatozóides foram detectados em um esfregaço vaginal foi designado como o dia da concepção (ou dia 0 de gestação). Durante a gestação e lactação as mães foram divididas em dois grupos, um grupo recebeu dieta normoproteica com 17% de caseína, enquanto outro grupo recebeu uma dieta hipoprotéica com 8% de caseína (REEVES et al., 1993). No dia pós-natal 1 as ninhadas foram reduzidas para oito filhotes por mãe. O desmame foi realizado aos 22 dias de idade. Apenas um filhote macho de cada ninhada foi utilizado para cada grupo experimental. Assim, cada ninhada normoproteica forneceu um filhote para o grupo controle (C, n = 6) e um filhote para o grupo treinado (T, n = 6). Da mesma forma, cada ninhada hipoproteica forneceu um filhote para o grupo hipoproteico (LP, n = 6) e um para o hipoproteico-treinado (LP+T, n = 6). Os filhotes restantes foram utilizados para outros experimentos.

Aos 60 dias de vida, os ratos treinados (T e LP+T) foram submetidos a um programa de treinamento de resistência (5 dias por semana, durante 8 semanas) que consistiu em subidas em uma escada, com 70° de inclinação, carregando uma sobrecarga progressivamente aumentada presa em sua cauda. Os grupos controle (C e LP) permaneceram em suas gaiolas. Durante o programa de treinamento todos os animais foram manipulados diariamente para registro do peso corporal. Os ratos foram alojados em gaiolas coletivas (3 ratos por gaiola) e receberam água e ração padrão *ad libitum*.

Todos os animais foram obtidos do biotério de criação do departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, e mantidos em condições padrões de biotério em uma sala com temperatura de 22 ± 1 °C e ciclo claro-escuro invertido (escuro de 06:00 as 18:00hs)

Programa de treinamento de resistência diário

O programa de treinamento foi baseado no princípio da sobrecarga e exigiu a realização bem sucedida de um número de séries e repetições com intervalo para descanso controlado. O aparelho para treinamento consistiu de uma escada, com 132 cm e 87 degraus de metal. A angulação do aparelho era ajustável, entretanto foi mantida em 70° entre a base da escada e o piso (Figura 1A). Os animais deveriam subir a escada com uma sobrecarga progressiva fixada nas suas caudas. O suporte para a fixação da sobrecarga na cauda do rato consistiu de uma fita semi-elástica com um gancho na ponta e um recipiente cilíndrico no qual as cargas, confeccionadas com chumbo de pesca, foram colocadas (Figura 1B).

Antes do programa de treinamento físico de resistência, todos os animais foram adaptados ao aparato de treinamento durante cinco dias. O estímulo para subida foi um leve toque com os dedos na região dorsal dos animais. Durante a adaptação ao aparato de treinamento os ratos foram colocados em diferentes pontos a partir da base da escada.

Quarenta e oito horas após o período de adaptação, todos os animais de ambos os grupos foram submetidos a um teste de sobrecarga máxima. No primeiro teste de sobrecarga máxima, os ratos subiram, inicialmente, com uma sobrecarga de 75% do seu peso corporal (HORNBERGER e FARRAR, 2004). Foi considerada uma “subida de sucesso” quando o animal realizou a subida em um período inferior a 40 segundos e não soltou a escada. Após cada subida, foram adicionados 30 gramas na sobrecarga até os animais não conseguirem realizar a tarefa. Essas unidades de 30 gramas foram consideradas unidades de sobrecarga. Após 3 falhas consecutivas, a última subida de sucesso foi registrada e considerada a sobrecarga máxima. Na determinação da sobrecarga máxima das semanas subsequentes, as

primeiras subidas foram realizadas com 80% e 100% da sobrecarga máxima e acrescidas unidades de 30 gramas até as falhas. Os intervalos entre as subidas em todos os testes foram de 120 segundos.

De acordo com a sobrecarga máxima individual, os ratos do grupo treinado foram submetidos a um programa de treinamento de resistência, 7 a 10 subidas por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas com uma sobrecarga presa em sua cauda aumentada progressivamente. O comprimento da escada permitiu a realização de 10 a 16 movimentos alternados em cada subida. Cada sessão de treinamento iniciou com uma sobrecarga correspondente a 30%, 50% e subidas subsequentes a 80% da sobrecarga máxima individual (total de 10 subidas). O tempo de descanso entre as subidas foi mantido em 90 segundos. As sessões de treinamento e os testes de sobrecarga máxima foram realizados 2 horas depois do início do ciclo escuro.

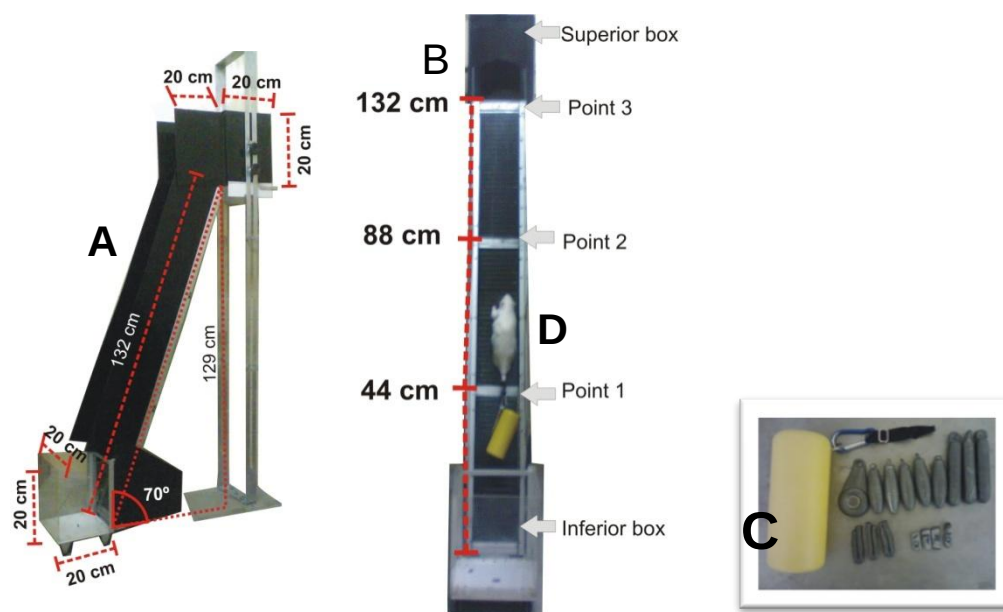


Figura 1. (A) Vista lateral do aparato de treinamento (uma escada com altura: 129 centímetros; largura: 20cm; comprimento: 132 centímetros; com 87 degraus e 1 cm entre os degraus) **(B)** Vista frontal do aparato de treinamento, pontos para colocar os ratos (caixa inferior transparente, ponto 1 a 44 centímetros da base, ponto 2 a 88 cm da base, ponto 3, para 132 centímetros a partir da base e caixa superior escura). **(C)** O suporte para a fixação da sobrecarga que consistia em um recipiente onde as cargas foram colocadas e uma fita de fixação formada de fita semi-elástica com um gancho na extremidade. A fita de fixação foi cuidadosamente fixada na porção proximal da cauda com uma fita adesiva. As cargas foram confeccionadas com chumbo de pesca e possuíam pesos diferentes **(D)** Rato subindo a escada com uma sobrecarga fixa em sua cauda.

Análise histoquímica muscular

Os músculos sóleo e EDL foram dissecados e imersos em n-hexano (C_6H_{14}) a uma baixa temperatura e congelados em nitrogênio líquido. Secções transversais em série (10 μ m) foram cortadas em um criostato (Jung Frigocut CM1100-Leica; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) mantido a $-20^{\circ}C$ e coradas para atividade da ATPase miofibrilar (PESTRONK et al., 1992). As secções foram colocadas em temperatura ambiente e incubadas durante 10 min em 400 mL de solução de pré-incubação (contendo 280 mL de 0.2 M de ácido acético e 120 mL de 0.2 M de acetato de sódio) em pH 4.3 ou 4.55. As secções foram então lavadas em água destilada e incubadas a $37^{\circ}C$ em uma solução contendo ATP (pH 9.4) por 40 min. Em seguida, as secções foram lavadas em água destilada, mergulhadas durante 5 minutos em cloreto de cobalto a 2% ($CoCl_2$) e banhadas quatro vezes em água destilada. Para revelação foi usado sulfeto de amônio a 5%). As secções foram então desidratadas em soluções crescentes de etanol (70° a 100°) e imersas em solução de tolueno. Após a secagem foram montadas usando Entellan[®] (Merck, Germany) (PESTRONK et al., 1992).

As secções foram analisadas com um microscópio de luz (Olympus Optical U-CMAD-2, Tokyo, Japan; objetiva de 10x) conectado a um computador (TV TUNER APPLICATION – TelSignal Company Limited, Taiwan). As imagens das secções do sóleo e EDL foram capturadas e armazenadas no computador para análises posteriores. As fibras musculares foram marcadas em relação aos três tipos principais de fibras (I, IIa e IIb) com base em diferenças na intensidade de coloração para ATPase após pré-incubação em meio ácido (pH 4.3 e 4.55) (BROOKE e KAISER, 1970). De acordo com as diferentes intensidades de coloração, a seguinte classificação foi usada para ambos os músculos: em pH 4.3, tipo I, mais escura e tipo II, mais clara e em pH 4.55, tipo I, mais escura; tipo IIa, mais clara e tipo IIb, cinza. A Histoquímica foi realizada utilizando análise de imagem computadorizada de software Mesurim PRO (desenvolvido por Jean-François Madre-Amiens, França). A composição do tipo de fibra muscular foi determinada por contagem de fibras de cerca de 1500 em campos que foram distribuídos igualmente sobre a amostra.

Análise da expressão de genes através de PCR - Real time

O RNA total da medula espinal, córtex motor e cerebelo foi extraído com 1 ml de reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad CA EUA) de acordo com as instruções do fabricante e a sua concentração foi determinada a partir da medida da absorbância a 260 nm.

A Síntese de cDNA foi realizada usando um kit QuantiTect® de transcrição reversa (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Para eliminar o DNA genômico, a reação foi preparada com 2 µl de tampão de gDNAWipeout, 7 ×; as amostras de RNA; e a quantidade de água isenta de RNase necessário para alcançar um volume final de 14 µl. A reação de transcrição reversa do QuantiTect® mix foi preparada usando 1 µl Quantiscript Transcriptase Reversa; 4 µl de tampão de RT Quantiscript, 5 ×; 1 ml RT Primer Mix; e 14 µL da reação de eliminação, que contém a amostra de RNA. Em seguida, uma alíquota de cada reação de transcrição reversa, a qual contém uma mistura de ADNc, foi armazenado a -20 °C.

A reação de PCR foi feita usando o SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®) Kit e analisado em tempo real, através de um sistema automatizado de detecção de sequência denominado Rotor-Gene® TM RG 3000 (Corbett Life Science, Australia) para determinar a expressão de mRNA das amostras. O volume total da reação foi o 25 µl e incluiu 12.5 µl do composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®), 2 µl de cDNA (utilizado como um molde para a reação), 2.5 µl dos primers *sense* e *antisense* e 5.5 µl de água livre de RNase. As reações foram incubadas a 95°C durante 5 minutos para ativar a enzima DNA polimerase, seguido por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C para desnaturação e 10 segundos a 60°C para extensão e coleta do sinal fluorescente. A sequência dos primers utilizados para a amplificação foram: β -actin - forward, 5'- ACT ATC GGC AAT GAG CGG TTC C - 3' e reverse, 5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AAC ACA G - 3'; BDNF – forward, 5' - TTG CTG GTC TTG GGC TTC TGG - 3' e reverse, 5' - GGA ACC TAA CAG CAT TGA CCC AGA - 3'; IGF-1 - forward, 5' - GCC GCT TCC TTC ACA GAA TCT AAT AAT C - 3' e reverse, 5' - CGA AAG CAA TAG CAA CTG GGT GG - 3'. Os primers foram sintetizados e purificados por IDT - Integrated DNA Technologies (EUA). Os níveis de expressão relativa de mRNA para BDNF e IGF-1 na medula espinal, do cerebelo e córtex motor foram calculados usando o Ct (limiar de ciclo) método comparativo (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001), com β -actina como um gene de normalização.

Avaliação da atividade locomotora

A atividade locomotora foi avaliada de acordo com o protocolo sugerido por Aragão et al (2011). Resumidamente, o aparelho de atividade locomotora consistiu de um campo aberto circular (Ø 1m) delimitado por paredes de 30 cm de altura. No topo foi colocada uma câmera infravermelha (2,35m de altura, VTV® CCTV SISTEM modelo NT-6638 C colorida, 0,1 Lux, lente 3,6) para gravar imagens dos filhotes (ARAGAO *et al.*, 2011). Os filhotes foram

colocados em campo aberto durante 2 minutos na primeira (valores pré) e oitava semana semana de treinamento (valores pós). Todos os animais foram expostos ao campo aberto na 4ª semana, sem quantificação de atividade, como critério de manutenção da habituação ao campo aberto. Os vídeos foram analisados por um software de análise automática de vídeos de atividade locomotora (2.1 beta) desenvolvido em parceria com o Centro de Informática da Universidade Federal de Pernambuco (CIn-UFPE). Esta análise forneceu a distância percorrida (m), distância rotacional (m), a velocidade média (m/s), a velocidade máxima (m/s), a potência média (mW), tempo imóvel (s), o número de paradas e tempo em cada parada (s) (Tabela 1) (ARAGAO *et al.*, 2011).

Tabela 1. Descrição dos parâmetros de atividade locomotora que foram avaliadas no campo aberto.

Parâmetros	Descrição
Distância Percorrida (m)	Soma de todos os deslocamentos realizados pelo animal que foi capaz de deslocar o seu centro de massa ao longo do comprimento do seu raio
Distância rotacional (m)	Soma de todos os pequenos deslocamentos realizados pelo animal que não foi maior que o comprimento do seu raio. Esta análise foi incluída para levar em conta pequenos movimentos da cabeça e dos membros
Velocidade média (m/s)	Relação entre distância percorrida e tempo total do vídeo analisado.
Velocidade máxima (m/s)	Maior velocidade obtida durante o teste
Potência Média (mW)	A potência produzida durante o período de deslocamento.
Tempo imóvel (s)	O tempo total que o animal permaneceu em parado no campo aberto
Número de paradas	Número total de paradas feitas no campo
Tempo em cada parada (s)	Relação entre o tempo imóvel e o número total de paradas

Análise estatística

Os valores são expressos em média e erro padrão da média. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o *t-test student* de medidas independentes. Para análise do peso corporal e da sobrecarga máxima ao longo das oito semanas de treinamento, foi utilizado o teste ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni. Para comparação entre os grupos quanto ao percentual dos tipos de fibras, foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi mantido em 5% em todos os casos. Toda análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS - ARTIGO 1

6.1. RESULTADOS - ARTIGO 1

Title: Daily resistance physical training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurotrophic factors in young rats.

Running title: Neurotrophic factors and resistance physical training.

Introduction

Resistance physical training is characterized by the movement of body segments with application of an overload increased progressively along of a determined period of time with controlled intensity (Kraemer *et al.* 2007; Holm *et al.* 2008). During a program of resistance physical training, the adjustment of the intensity can be done in the number of repetitions (complete movement of an exercise including concentric and eccentric contractions of the skeletal muscle), velocity of execution (amount of repetitions in an interval of time), interval between the series (group of repetitions developed continuously without interruption) and in the maximum overload utilized (maximum amount of weight applied to the body segments) (Kraemer *et al.* 2007; Holm *et al.* 2008).

Different programs of resistance physical training for rats have used distinctive protocols based on the number of sessions per week (3 – 4 times a week) with intervals of 48 hours between the sessions (Hornberger and Farrar 2004; Lee *et al.* 2004b; Duncan *et al.* 1998; Donatto *et al.* 2013). Previous studies utilized the model of climbing a vertical ladder during 8 weeks, with 48 hours interval between sessions and the maximum overload tests performed in each session (24 maximum overload tests during the program) (Hornberger and Farrar 2004; Lee *et al.* 2004b). These programs were based on human studies and it could be not enough effective to induce changes in strength and muscle fiber type in rats. In human, the control of these variables is well established but, in experimental models, it is still difficult to establish a suitable apparatus of training, sets of exercise and the time of rest between the exercise bouts. Thus, improved muscle strength and power are observed in response to resistance exercise using several distinct apparatuses and protocols of training. However, the effect of a protocol of resistance exercise based on the performance in a weekly maximum overload test and individually adjusted for each rats has not been evaluated in previous models.

Resistance physical exercise is associated with gain in muscular strength, bone mineral density, anaerobic endurance, fatigue resistance (Duncan *et al.* 1998; Hornberger and Farrar

2004; Yarasheski *et al.* 1990). In the process of aging, resistance training programs are often used to combat the substantial declines in muscular strength, sarcopenia, motor coordination and disabilities by improving or maintaining functional capabilities (Barry and Carson 2004). In rats, exercise by ladder climbing activity is associated with muscle hypertrophy, changes in muscle fiber phenotype, and neuromuscular adaptations (Begue *et al.* 2013; Carroll *et al.* 2001b; Hornberger and Farrar 2004). More recent literature has reported that resistance exercise may be a promising intervention for some chronic diseases (Donatto *et al.* 2013).

Physical training can enhance brain function by improving neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis and increase in growth factors such as Brain Derived Nerve Factor (BDNF) and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) (Llorens-Martin *et al.* 2008). BDNF is a member of the neurotrophin family, and it is largely expressed in the developing and adult mammalian brain and peripheral tissues, such as the muscle and adipose tissue (Huang *et al.* 2014). Animal and humans studies have verified that aerobic physical exercise increase the levels of BDNF mRNA and protein in the hippocampus and other brain regions (Huang *et al.* 2014; Knaepen *et al.* 2010). IGF-1 is peripherally produced by liver and muscle, but IGF-1 plays pleiotropic roles in the nervous system and has been shown to affect development/growth of the brain (Vardatsikos *et al.* 2009). For instance, resistance training (8 weeks of progressive resistance exercise in a vertical ladder apparatus) improved several aspects of cognition by improving the performance in a hippocampus-dependent memory task with a concomitant increase of IGF-1 level in the rat model (Cassilhas *et al.* 2012). Less is known about the effects of resistance physical training on the expression of IGF-1 and BDNF on motor cortex, spinal cord and cerebellum, brain structure related to movement control and coordination.

The objective of the present study was to validate a model for resistance exercise for rats, capable to improve the performance during exercise sessions, induce typological adaptation in muscle fiber and changes in the expression of neurotrophic factors as BDNF and IGF-1.

Methods

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco (Protocol number: 23076.005155/2009-09) and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Bayne 1996).

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus* 60 days old, 270 – 280 g) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. Rats were maintained at room temperature, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and in a light–dark cycle (dark 6:00 a.m. - 6:00 p.m.). The animals were housed in a collective cage and received water and standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids) *ad libitum*. The animals were randomly assigned in two groups: non-trained (NT, n=13) and trained (T, n=18). Trained animals climbed a vertical ladder while carrying progressive overload (resistance training, 5 days per/week, during 8 weeks). Body weight was weekly recorded during the protocol of physical training. Forty-eight hours after the last session of training, rats were killed by decapitation and *soleus* and EDL muscles were removed and analyzed. Then, spinal cord, motor cortex and cerebellum were removed for BDNF and IGF-1 gene expression analysis.

Program of daily resistance physical training

The apparatus consisted of a vertical ladder (height = 129 cm; breadth = 20 cm; size = 132 cm; 87 steps; 70° incline and 1 cm between the steps) [Figure 1]. Rats climbed up the ladder with progressive overweight secured to their tails. The support for fixing the overload consisted of a semi-elastic tape with a hook on the tip and a cylindrical container with different weight steel loads. The period of adaptation consisted of 5 days of exercise before the training protocol. From the first to the third day, rats climbed up 10 times the vertical ladder without overload. At the fourth day, rats climbed up the ladder with an empty container fixed in the tail. At the fifth day, rats climbed the ladder with an overload of 5% of their body mass. The interval between the sets of climb during adaptation period was fixed in 30 seconds.

Forty-eight hours after the period of adaptation, all animals of both groups were submitted to a maximum overload test and repeated in each week. At the first maximum overload test, rats had to climb up initially with an overload of 75% of their body weight according to previous study (Hornberger and Farrar 2004). It was considered a “success climb” when the animal climbed the entire length of the ladder taking a time shorter than 40 seconds. After each climb, it was added 30 grams in the overload until the animal not to be able to perform the task (Donatto *et al.* 2013). These units of 30 grams were considered as units of overload. Failure was determined when the animal could not climb up the ladder after 3 successive attempts. Then, the last success climb was recorded and considered the

maximum carrying capacity for that week of training (or maximum overload). For the subsequent weeks of training, the first climbs were performed with 80% to 100% of the maximum overload measured in the beginning of the program and added 30 grams in each climb as previously described. The intervals between the climbs during the tests were fixed in 120 seconds.

The program of daily resistance physical training consisted of 10 climbs per day, 5 days/week, during 8 weeks with a progressive increasing of the overload. The length of the ladder allowed performing 10-16 alternated movements in each climb. Each session of training started with an overload corresponding to 30% (first climb), 50% (second climb) and 80% (from third to tenth climb) of the individual maximum overload (measured in the week before). The time for rest between climbs during the program of training was fixed in 90 seconds. The protocol of physical training is shown in Figure 2.

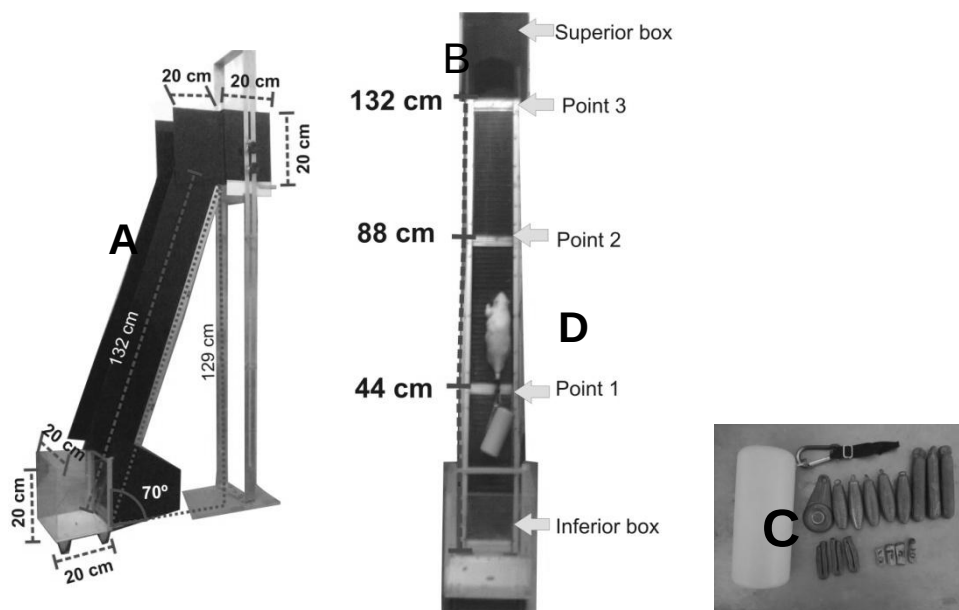


Figure 1. (A) Lateral view of the apparatus of training (height: 129cm; breadth: 20cm; size: 132cm; with 87 steps and 1 cm between the steps). (B) Frontal view of the apparatus of training, points for place the rats (transparent inferior box, point 1 to 44cm from the base, point 2 to 88 cm from the base, point 3 to 132cm from the and dark superior box). (C) The support to attach the overload and the different loads; (D) Rat climbing the ladder with an overload fixed in its tail.

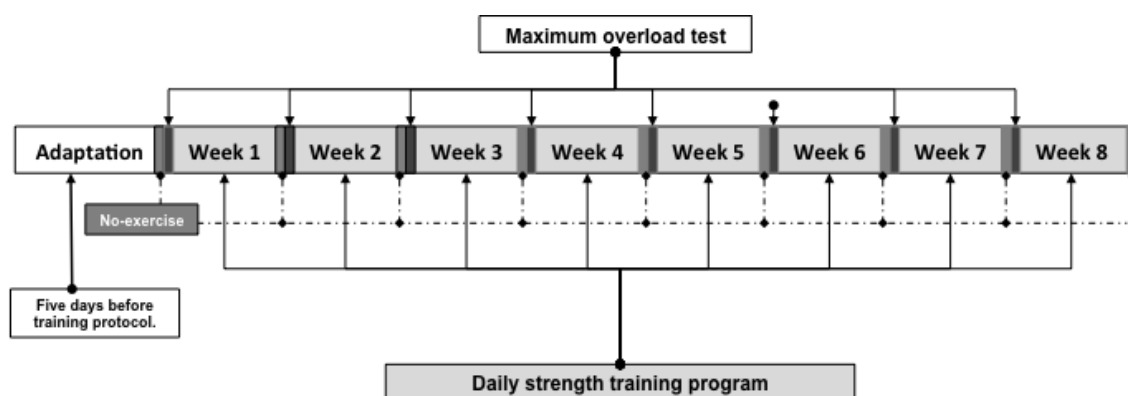


Figure 2. Description of daily resistance training program.

Histochemical analysis

The *soleus* and EDL muscles were dissected and immersed in n-hexane (C₆H₁₄) at a low temperature and were frozen in liquid nitrogen. Serial cross sections (10 µm) were cut with a cryostat (Jung Frigocut CM1100-Leica; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) maintained at -20°C and stained for myofibrillar ATPase (Pestronk *et al.* 1992). The sections were left at room temperature and were incubated for 10 min in 400 mL pre-incubation solution (containing 280 mL of 0.2 M acetic acid and 120 mL of 0.2 M sodium acetate) in pH 4.3 or 4.55. The sections were then washed in distilled water and incubated at 37°C in a solution containing ATP (pH 9.4) for 40 min. Next, sections were washed in distilled water, rinsed for 5 min in a 2% CoCl₂ solution and rinsed four times in distilled water. For revelation, it was used 5% ammonium sulphate. The sections were then dehydrated in crescent ethanol baths (70° to 100°) and immersed in toluene solution. After drying, the sections were mounted using a New Entellan® (Merck, Germany) (Pestronk *et al.* 1992).

The sections were analysed with a light microscope (Olympus Optical UCMAD-2, Tokyo, Japan; 10x objective lens) connected to a computer (TV TUNER APPLICATION – TelSignal Company Limited, Taiwan). The images of the histological cross-sections of the *soleus* and the EDL were captured for further analysis. Muscle fibres were labelled with respect to the three major types (I, IIa and IIb) of fibres on the basis of differences in the staining intensity for ATPase after acid preincubation (pH 4.3 and 4.55) (Brooke and Kaiser 1970). According to the different staining intensities, the following classification was used for both muscles: at pH 4.3 (type I, darkest and type II, lightest); at pH 4.55 (type I, darkest; type IIa, lightest and type IIb, grey) (Brooke and Kaiser 1970). Histochemical analysis was performed using computerised image analysis from Mesurim PRO 3.2 software (developed by

Jean-François Madre-Amiens, France). The muscle fibre type composition was determined by counting approximately 1500 fibres in fields that were equally distributed over the sample.

Real-time RT-PCR

The total RNA of the spinal cord, motor cortex and cerebellum was extracted using 1 ml of Trizol (Invitrogen®, Carlsbad CA USA) reagent according to the manufacturer's instructions, and its concentration was determined from the absorbance measure at 260 nm.

cDNA synthesis was done using a QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen®, Hilden, Alemanha) kit. To eliminate genomic DNA, a reaction was prepared using 2 µl gDNA Wipeout Buffer, 7×; RNA samples; and the amount of RNase-free water necessary to reach a final volume of 14 µl. The reverse transcription QuantiTect® reaction mix was prepared using 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase; 4 µl Quantiscript RT Buffer, 5×; 1 µl RT Primer Mix; and 14 µl of the elimination reaction, which contains the sample RNA. Then, an aliquot of each reverse transcription reaction, which contains a cDNA mix, was stored at -20°.

The PCR reaction was done using the SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®) Kit and was analyzed in real time through an automated system of sequence detection called the Rotor-Gene® TM RG 3000 (Corbett Life Science, Australia) to determine the mRNA expression of the samples. The total volume of the reaction was 25 µl and included 12.5 µl of the fluorescent compound SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen®), 2 µl of cDNA (used as a mold to the reaction), 2.5 µl of the sense and antisense primers and 5.5 µl of RNase-free water. The reactions were incubated at 95 °C for 5 minutes to activate the DNA polymerase enzyme, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95 °C for denaturation and 10 seconds at 60 °C, extension and collection of the fluorescent signal. The sequence of primers used for amplification were as follows: *β-actin* - forward, 5'- ACT ATC GGC AAT GAG CGG TTC C - 3' and reverse, 5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AAC ACA G - 3'; *BDNF* – forward, 5' - TTG CTG GTC TTG GGC TTC TGG - 3' and reverse, 5' - GGA ACC TAA CAG CAT TGA CCC AGA - 3'; *IGF-1* - forward, 5' - GCC GCT TCC TTC ACA GAA TCT AAT AAT C - 3' and reverse, 5' - CGA AAG CAA TAG CAA CTG GGT GG - 3'. The primers were synthesized and purified by IDT – Integrated DNA Technologies (EUA). The relative expression levels of mRNA BDNF and IGF-1 in the spinal cord, cerebellum and motor cortex were calculated using the Ct (threshold cycle) comparative method (Livak and Schmittgen, 2001), with *β-actin* as a normalizing gene.

Statistical analysis

To analyze the body weight and maximum overload throughout 8 weeks, it was used ANOVA two-way test followed by Bonferroni test. To analyze the proportion of fiber type in skeletal muscle and the expression of mRNA in nervous system, it was used unpaired *t*-test student. The significance level was maintained in 5%. For statistical analyze, it was used GraphPad Prism 5 program for Windows (GraphPad Software ®. Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

After eight weeks of resistance physical training, both groups presented the same gain of body weight (NT initial = 280.1 ± 45.3 and final = 355.5 ± 41.0 , T initial = 266.3 ± 23.8 and final = 365.3 ± 54.7 , $\approx 33\%$ initial vs final). For T animals, there was a progressive increase in the maximum force (determined by the maximum overload test) throughout the weeks of training, while NT animals remained in a constant maximum overload (Figure 3A). After the weeks of training, T animals showed a higher maximum overload than NT animals (NT: 101.1 ± 13.6 ; T: 232.1 ± 14.3 , $p < 0.001$) (Figure 3B). T animals presented a constant capacity to carry the units of overload (units of 30 grams) until the third week. There was a reduction of 1 unit followed by a constant of three units of overload. NT animals presented a progressive decline throughout the weeks with stabilization in the last three weeks of training (Figure 3C).

In *soleus* muscle, the daily resistance training did not alter the proportion of fiber type I (NT: 85.5 ± 2.7 ; T: 84.7 ± 2.2) and type II (NT: 14.5 ± 2.7 ; T: 15.2 ± 2.1). Similarly, there was no difference in the percentage of fiber in the EDL muscle: fibers type I (NT: 3.4 ± 0.47 ; T: 5.4 ± 0.82) and type II (NT: 96.6 ± 0.47 ; T: 94.6 ± 0.82). With preincubation at 4.55 pH, it was possible to evaluate the subtype of fibers (purely oxidative, type I; purely glycolytic, type IIb and oxidative-glycolytic type IIa) from *soleus* and EDL muscles. The resistance physical training did not alter the proportion of subtype of fibers in *soleus* muscle: type I (NT: 84.9 ± 2.06 ; T: 83.6 ± 2.68); type IIa (NT: 10.9 ± 1.32 ; T: 13.4 ± 2.53); type IIb (NT: 4.1 ± 0.82 ; T: 2.9 ± 0.47) (Figure 4A). In EDL muscle, the resistance physical training increased the proportion of fibers type IIb (NT: 19.8 ± 2.14 ; T: 35.7 ± 2.1) and decreased the proportions of fibers type IIa (NT: 77.5 ± 2.4 ; T: 59.6 ± 2.2) (Figure 4B).

There were no differences in the gene expression of the BDNF in the spinal cord, cerebellum and motor cortex. For the gene expression of IGF-1, T animals presented a reduction in the cerebellum (NT: 1.025 ± 0.12 ; T: 0.57 ± 0.11) (Figure 5).

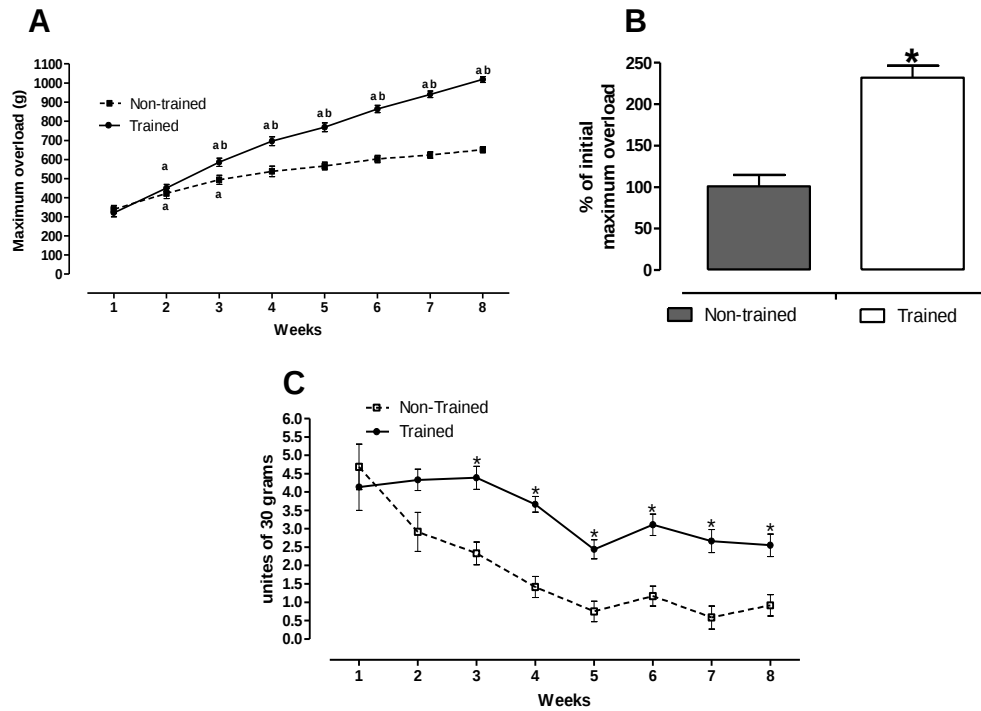


Figure 3. (A) Maximum overload, (B) percentage of the increase in maximum overload carried relative to the pre-training values in each groups, and (C) Units of overload (30 grams) carried by animals during the maximal overload test. Animals were submitted to an eight weeks of resistance physical training. Groups are: Trained (T, n = 18) and Non-trained (NT, n = 13). Data are presented as mean $\pm$ SEM. ^a p < 0.05 compared to previous week in same group using ANOVA two-way. ^b represents p < 0.05 compared to group NT using ANOVA two-way. *p < 0.05 vs group Non-trained using t-test for comparing of the groups.

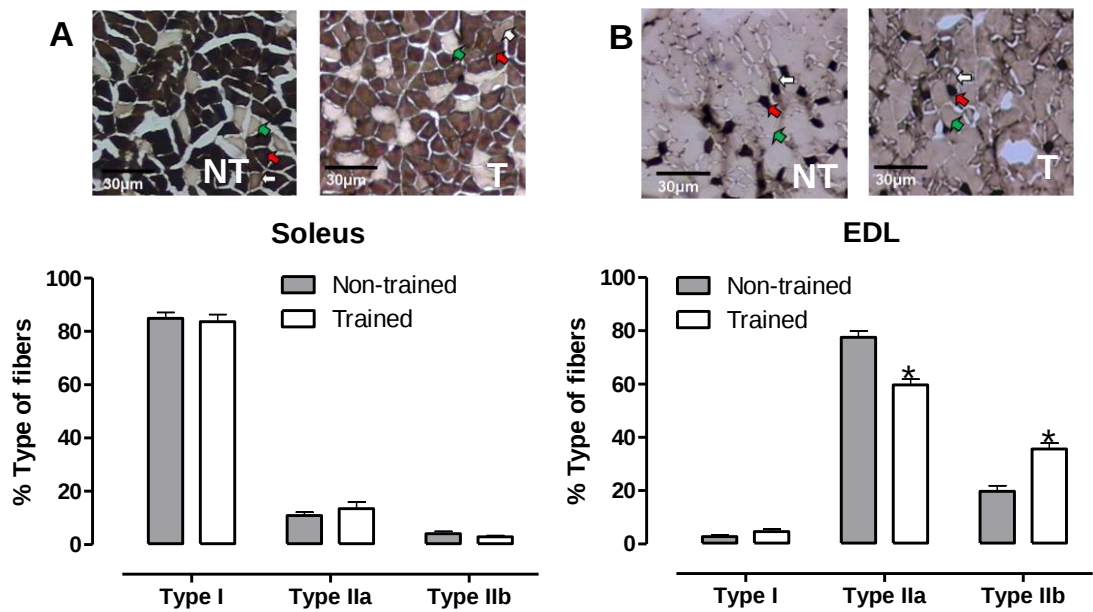


Figure 4. Images of the transverse sections (4x objective) *soleus* (A) and EDL (B) pre-incubated at pH 4.55. Red arrows indicate type I fibers, green arrows indicate type IIa fibers and white arrows indicate type IIb fibers. The charts indicate the proportion of muscle fiber type I, IIa and type IIb of animals submitted to a resistance training during 8 weeks (Trained: T, n = 6) or submitted only to test the maximum overload capacity (Non-trained: NT, n = 6). Measurements were performed 48 hours after the last training session. Data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ compared to the Non-trained group using T-test of student for statistical analyses.

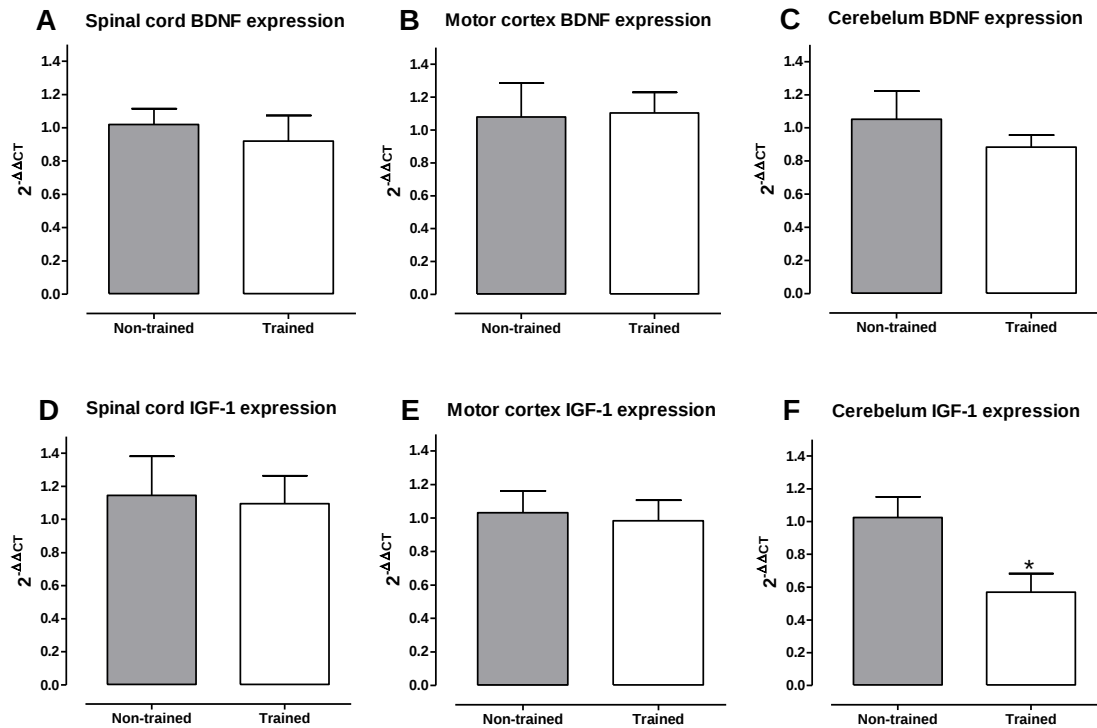


Figure 5. Relative expression of mRNA of BDNF in the spinal cord (A) motor cortex (B) and cerebellum (C) and relative expression of mRNA of IGF-1 in the spinal cord (D) motor cortex (E) and cerebellum (F). Animals were submitted to a resistance training during 8 weeks (Trained: T, n = 5) or submitted only to test the maximum overload capacity (Non-trained: NT, n = 5). Measurements were performed 48 hours after the last training session. Data are presented as mean $\pm$ SEM. The level of expression was obtained by real time PCR and the results normalized by non-trained group ($2^{-\Delta\Delta CT}$ where $\Delta\Delta CT = (CT_{B1} - CT_{B2}) - (CT_{A1} - CT_{A2})$). * $p < 0,05$ compared to the non-trained group using T-test student for statistical analyses.

DISCUSSION

Resistance physical training is related to adaptations according to the amount of work performed during the exercise sessions and the interval between the exercises bouts (Hornberger and Farrar 2004). The sum of these responses produces increases in performance capacity (Leandro *et al.* 2007). In the present study, rats were submitted to a daily resistance exercise with an interval of 24 hours between the sessions of training. This seemed to induce a suitable adaptation in the maximum overload capacity of rats. A previous study submitted rats to physical training in the ladder, 4 days per week, with intervals of 24 and 48 hours between the sessions (Duncan *et al.* 1998). It was observed an augment in maximum overload (140% of body weight) only after 24 weeks (Duncan *et al.* 1998). Our data showed that 8 weeks of

daily resistance training were enough to increase $238 \pm 8.6\%$ in maximum overload capacity. In addition, there were changes in glycolytic muscle typology and increased force and power output. Indeed, it has been shown that resistance exercise is associated with high gains in performance, muscle potency and force, and muscle fiber cross-sectional area (Duncan *et al.* 1998; Hornberger and Farrar 2004; Philippe *et al.* 2015). However, molecular changes in the expression of BDNF and IGF-1 in the central structures related to the movement (spinal cord, cerebellum and motor cortex) were not pronounced except for the reduced expression of IGF-1 in the cerebellum of trained rats.

Animal models allow the evaluation of training effects according to loads and intensities of effort with high accuracy, especially in the context of resistance exercise on a climbing ladder (Philippe *et al.* 2015). Likewise, it is possible a more precise physiological evaluation and biological information related to adaptive processes during physical training (Leandro *et al.* 2007). In the present study, resistance exercises were performed between 70% and 80% of the maximum load weekly adjusted according to the maximal overload test performed at the day before the week of training. Trained animals maintained the capacity to carry the units of overload (units of 30 grams) between three or four units throughout the weeks of training. The reduction in the units of overload can be related to the increased synchronization in the firing of motor units, which is likely to decrease the ability to steadily produce force (Yao *et al.* 2000).

Skeletal muscle has intrinsic ability to adapt to different types of effort by changing its mass and fibers type (Campos *et al.* 2002). In the present study, it was observed increases in the performance (gain of muscle strength) and in fiber type IIb in glycolytic muscle (EDL) but not in soleus muscle. Aligned with our finding, there was an increase in the percentage of type IIb fibers but no changes in type I fibers in the deep region of the *rectus femoris* of young rats trained to lift progressively heavier weights in a ladder (20 times/day, 5 days/week during 8 weeks) (Yarasheski *et al.* 1990). On the other hand, a previous study analyzed the composition of myosin heavy chain (MHC) in muscle *flexor halluc longus* (FHL, predominantly glycolytic) of rats submitted to resistance training in ladder (3 sessions per week, during 8 weeks with 50, 75, 90 and 100% of maximum overload), and observed an increase in the proportion of MHCIIa (Lee *et al.* 2004a). A hypertrophy of 48% of fiber IIx in *flexor digitorum profundus* (FDP) muscle was seen in rats submitted to a protocol of resistance physical training (climb 1 meter while carrying 150% of their body mass during 4 weeks) (Begue *et al.* 2013). The apparent divergence in these findings is indicative of the

varied existence of protocols for resistance training (interval between exercise bouts, high of the stairway and percentage of maximum overload). However, the development of a protocol of resistance exercise that increase the type IIb muscle fibers is important for special population that present poor muscle strength and reduced balancing ability related to muscle atrophy, undernutrition, aging, insulin resistance, and cancer-induced cachexia. A recent study showed that resistance exercise training (rats climbed a vertical ladder with an extra load attached to the tail, representing 75-90% of total body mass, 3 times per week, for 8 weeks) prevented the symptoms of cancer cachexia such as anorexia, sarcopenia, and chronic systemic inflammation (Donatto *et al.* 2013). This kind of intervention can be considered as a non-pharmacological therapy in the management of this syndrome.

Resistance training can alter the manner in which trained muscles are recruited by the central nervous system such that a greater degree of muscle activation is generated by the same amount of cortical input (Carroll *et al.* 2001a). In the present study using Real-time quantitative PCR technique, there were no changes in the expression of BDNF and IGF-1 genes in the spinal cord and motor cortex. It can be suggested that there is an adaptive mechanism induced by resistance training that minimize cortical input necessary to elicit a given level of force. In addition, this adaptation can also produce an increase in the coordinated movements by reducing the level of central drive and the functional interference provided by the motor cortex and spinal cord (Carroll *et al.* 2001a; Carroll *et al.* 2002). In addition, the increased levels of gain of muscular strength can be associated with a decrease in activation of some central areas of the nervous system related to the movement (Carroll *et al.* 2001a). On the other hand, our findings showed a reduction in the expression IGF-1 in the cerebellum. Indeed, only small amounts of IGF-1 mRNA have been detected in the adult cerebral cortex and in the striatum (Rotwein *et al.* 1988), and the main origin of IGF-1 in the brain is peripheral (liver and skeletal muscle) (Rotwein *et al.* 1988). Approximately 95% of the IGF-I that acts on the brain is derived from the liver (Carro *et al.* 2000). Physical exercise is known to increase brain uptake of IGF-1, at least by increasing the level of megalin, a transporter involved in IGF-1 transport into the brain (Carro *et al.* 2000). It is possible that the high level of plasmatic concentration of IGF-1 induced by resistance physical training (Cotman *et al.* 2007) derived from periphery induced a negative feedback consequently reduced the production of IGF-1 by the cerebellum.

CONCLUSION

In the present study, a protocol of daily resistance physical training was developed to improve the performance and muscle strength of male young Wistar rats. The protocol of resistance exercise was based on the performance in a weekly maximum overload test. Our data showed that only 8 weeks of daily resistance training were enough to increase maximum overload capacity, force, power output and the proportion of glycolytic muscle fiber. However, there were no changes in the expression of BDNF and IGF-1 genes in the spinal cord and motor cortex. A peripheral adaptive mechanism can produce an increase in the coordinated movements and reduce the level of central drive for the functional interference provided by the motor cortex and spinal cord. Also, it is possible that the resistance physical training increases the peripheral production of IGF-1 and consequently reduced the production of IGF-1 by the cerebellum.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES) and State of Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE).

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Barry, B.K., and Carson, R.G. (2004). The consequences of resistance training for movement control in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59, 730-754.
- Bayne, C.G. (1996). American Academy of Home Care Physicians. Are you ready for this? *Home Care Provid* 1, 162-163.
- Begue, G., Douillard, A., Galbes, O., Rossano, B., Vernus, B., Candau, R., and Py, G. (2013). Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PLoS One* 8, e57141.
- Brooke, M.H., and Kaiser, K.K. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23, 369-379.
- Campos, G.E., Luecke, T.J., Wendeln, H.K., Toma, K., Hagerman, F.C., Murray, T.F., Ragg, K.E., Ratamess, N.A., Kraemer, W.J., and Staron, R.S. (2002). Muscular adaptations in

- response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88, 50-60.
- Carro, E., Nunez, A., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20, 2926-2933.
- Carroll, T.J., Barry, B., Riek, S., and Carson, R.G. (2001a). Resistance training enhances the stability of sensorimotor coordination. *Proc Biol Sci* 268, 221-227.
- Carroll, T.J., Riek, S., and Carson, R.G. (2001b). Neural adaptations to resistance training: implications for movement control. *Sports Med* 31, 829-840.
- Carroll, T.J., Riek, S., and Carson, R.G. (2002). The sites of neural adaptation induced by resistance training in humans. *J Physiol* 544, 641-652.
- Cassilhas, R.C., Lee, K.S., Venancio, D.P., Oliveira, M.G., Tufik, S., and De Mello, M.T. (2012). Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory. *Braz J Med Biol Res* 45, 1215-1220.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., and Christie, L.A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30, 464-472.
- Donatto, F.F., Neves, R.X., Rosa, F.O., Camargo, R.G., Ribeiro, H., Matos-Neto, E.M., and Seelaender, M. (2013). Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* 61, 426-432.
- Duncan, N.D., Williams, D.A., and Lynch, G.S. (1998). Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 77, 372-378. Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562367> doi: 10.1007/s004210050347.
- Holm, L., Reitelseder, S., Pedersen, T.G., Doessing, S., Petersen, S.G., Flyvbjerg, A., Andersen, J.L., Aagaard, P., and Kjaer, M. (2008). Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. *J Appl Physiol* 105, 1454-1461.
- Hornberger, T.A., Jr., and Farrar, R.P. (2004). Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 29, 16-31.
- Huang, T., Larsen, K.T., Ried-Larsen, M., Moller, N.C., and Andersen, L.B. (2014). The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review. *Scand J Med Sci Sports* 24, 1-10.

- Knaepen, K., Goekint, M., Heyman, E.M., and Meeusen, R. (2010). Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. *Sports Med* 40, 765-801.
- Kraemer, W.J., Hatfield, D.L., Spiering, B.A., Vingren, J.L., Fragala, M.S., Ho, J.Y., Volek, J.S., Anderson, J.M., and Maresh, C.M. (2007). Effects of a multi-nutrient supplement on exercise performance and hormonal responses to resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* 101, 637-646.
- Leandro, C.G., Levada, A.C., Hirabara, S.M., Manhaes-De-Castro, R., De-Castro, C.B., Curi, R., and Pithon-Curi, T.C. (2007). A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 21, 751-756.
- Lee, S., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Farrar, R.P. (2004a). Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* 96, 1097-1104.
- Lee, S., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Farrar, R.P. (2004b). Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* (1985) 96, 1097-1104.
- Llorens-Martin, M., Torres-Aleman, I., and Trejo, J.L. (2008). Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *Neuromolecular Med* 10, 99-107.
- Pestronk, G.J., Kaiser, K.K., and Brooke, M.H. (1992). ATPase stain in muscle histochemistry. *Muscle Nerve* 15, 258.
- Philippe, A.G., Py, G., Favier, F.B., Sanchez, A.M., Bonnieu, A., Busso, T., and Candau, R. (2015). Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *Biomed Res Int* 2015, 914860.
- Rotwein, P., Burgess, S.K., Milbrandt, J.D., and Krause, J.E. (1988). Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 265-269.
- Vardatsikos, G., Sahu, A., and Srivastava, A.K. (2009). The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 11, 1165-1190.
- Yao, W., Fuglevand, R.J., and Enoka, R.M. (2000). Motor-unit synchronization increases EMG amplitude and decreases force steadiness of simulated contractions. *J Neurophysiol* 83, 441-452.

Yarasheski, K.E., Lemon, P.W., and Gilloteaux, J. (1990). Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *J Appl Physiol*, 69, 434-437.

6.2. RESULTADOS - ARTIGO 2

6.2. RESULTADOS - ARTIGO 2

Title: Effects of daily resistance training on the locomotor activity in young rats submitted to a perinatal low-protein diet.

Short-title: Resistance training and locomotor activity in undernourished rats

Introduction

Locomotor activity (LA) is a set of movements that allows an individual to transport through space from one place to another. LA is an important component of exploration and spontaneous activities involved in numerous behavioral and physiological functions ¹. Fundamental locomotor skills are built during infancy and childhood and are essential for nervous and muscular integration for later dynamic base of movements ². LA and exploration are mediated by neurotransmitters that can be affected by environmental conditions (food and water availability, drugs, threat, light, temperature, noise, novelty, etc) and internal factors (hormones, circadian rhythm, age, gender, strain, etc) ^{1, 2}. Alterations of LA and exploration are also associated with some behavioral process, such as learning, memory, reward, anxiety and others ². In rodents, basal LA is generally assessed in a specific activity arena (open field) for short or intermittent periods ³.

Perinatal undernutrition can cause damage on the developing of the phases of locomotor activity ^{4, 5}. For example, in response to a neonatal multi-deficient diet (7.87% protein, 69.84% carbohydrate and 0.8% of lipids), it was observed a delay in the development of the nervous system and a reduction in the distance traveled in the locomotor activity test in rats (pups placed on square wood platform during 1 minute) ⁵. Gramsbergen and Westerga (1992) showed that undernourished rats (40% restricted of control food intake) submitted to LA test (at 30 days old, placed freely on elongated perspex runway during 15 minutes) presented lower distance traveled and velocity than their control pairs ⁶. The term “developmental plasticity” is used to explain that during early ontogeny, the developing organism passes throughout ‘critical windows’ of sensitivity or plasticity, during which environmental factors generate phenotypic plasticity or phenotype adjustments ^{7, 8}. Phenotypic plasticity can include adaptive plasticity in the morphology, physiology and behavior of all life form ⁹.

In the context of developmental plasticity, the effects of physical training have been studied extensively ¹⁰⁻¹³. However, most of studies have used protocols of aerobic physical training and less is known about resistance physical exercise. Resistance exercise is a type of exercise characterized by applying a progressive overload on the body ^{14, 15}. This type of exercise causes muscle hypertrophy and increased peripheral neural excitability, parameters that can influence the locomotion of the animal ^{15, 16}. Duncan et al (1998) subjected rats to 26 weeks of climb in ladder (with a gradual increase of overload attached in the tail) and observed an increment in the overload with a increase in the mass of the soleus and extensor digital longus (EDL) muscles ¹⁷. Using a similar resistance training protocol (climbing ladder, 3 times per week with 50%, 75%, 90% and 100% of the maximum overload), it was observed that eight weeks of training was enough to increase strength and cause hypertrophy in the flexor hallux longus (FHL) muscle ¹⁵.

Peri- and preconceptional periods have been considered to be critical for producing long-term effects on nervous and muscular development. It may predispose offspring to phenotypic changes in terms of locomotor activity. However, skeletal muscle is highly plastic, adapting to environmental challenges by regulating the composition of slow- and fast-twitch myofibers ¹⁸. Interventions including endurance exercise can induce the trans-differentiation of myofibers and potentially recovery the effects of maternal malnutrition ¹⁸. Thus, in the present study, we submit rats to a low protein diet during gestation and lactation. Then, rats were submitted to a daily resistance physical training in order to test the hypothesis that physical exercise is a well-known inducer of positive organic adaptations and able to revert the long-last effects of a perinatal low protein diet on the patterns of locomotor activity of the young offspring.

Materials and Methods

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco (Protocol number: 23076.042017/2013-89) and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals ¹⁹.

Animals

Twelve virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*, 12-wk-old) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil and were

maintained at a room temperature of 22 ± 1 °C with a controlled light–dark cycle (dark 06.00 am–6.00 pm). Females were placed into a standard cage and mated (2 female for 1 male) for a period of 2–4 days. The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception, day 0 of pregnancy. During pregnancy and lactation the mothers were divided in two groups, one group received normal protein diet with 17% of casein while other group received a low protein diet with 8% of casein²⁰. On postnatal day 1, litters were reduced to 8 pups per mother. Weaning was done at 22 days old. Only one male pup from each litter was used for each experimental group. Thus, each normal-protein litter provided one pup for control group (C, n = 6) and trained group (T, n = 6). Each litter low-protein provided one pup for low-protein group (LP, n = 6) and low-protein-trained (LP+T, n = 6). The remaining rats were used in other experiments.

Protocol of daily resistance training

At 60 days of life, the trained rats (T and LP+T) were submitted to a program of daily resistance physical training as previously described (Santos et al, 2015; under review). Brief, the training consisted of 10 climbs per day, 5 days/week, during 8 weeks with a progressive increasing of the overload. The length of the ladder allowed performing 10-16 alternated movements in each climb. Each session of training started with an overload corresponding to 30% (first climb), 50% (second climb) and 80% (from third to tenth climb) of the individual maximum overload (measured in the week before). The time for the rest between climbs during the program of training was fixed in 90 seconds. The control groups (C and LP) remained in their cages. During the program of training, all animals were daily handled for measurements of body weight. Rats were housed in a collective cage (3 rats per cage) and received water and standard laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids) *ad libitum*.

Assessment of locomotor activity

Locomotor activity was evaluated according to the protocol suggested by Aragão et al (2011). Briefly, the apparatus included consisted of a circular open field (Ø 1m) bounded by walls 30 cm high. In the top (placed to 2,35 m height) there was an infrared camera (VTV® CCTV SISTEM model NT-6638 C color, 0,1 Lux, lente 3,6) to record images from pups²¹. Pups were placed in the open field for 2 minutes the first (pre values) and eighth week (post values). All animals were exposed to the open field in the 4th week, without quantification of

activity, just as criteria of maintenance habituation. Images were recorded and analyzed by the software for automatic analyze of locomotor activity (2.1 beta). This analyze provided the distance traveled (m), rotational distance (m), average speed (m/s), maximum speed (m/s), average potency (mW), time immobile(s), number of stops and time in each stop (s) (Table 1)
21.

Table 1. Description of the parameters of locomotor activity that were evaluated in the open field.

Parameters	Description
Distance traveled (m)	Sum of all displacements performed by the animal in the length of its radius.
Rotational displacement (m)	Sum of all small displacements performed by the animal out of the length of its radius. This analysis included the small movements from the rat head and limbs
Average speed (m/s)	Ratio of total displacement and the time that the animal remained in movement.
Maximum Speed (m/s)	High speed obtained during the test
Average potency (mW)	Potency produced during the period of displacement.
Time immobile (s)	Total time that the animal remained standing in the open field
Number of stops	Total number of stops in the field
Time in each stop (s)	Ratio of the time immobile and the total number of stops

Statistical analysis

The values are presented as mean and standard error means (S.E.M.). ANOVA two-way test followed of the Bonferroni test were used for intra-group comparisons. To analyze the post vs pre training values was used paired T-test. The significance level was maintained in 5%. For statistical analyze was used GraphPad Prism 5 program for Windows (GraphPad Software[®], Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Pups born from mothers submitted to a low protein diet presented a lower birth weight than pups from control dams (LP = 5.3 ± 0.5 , C = 6.5 ± 0.8 , $p < 0.05$, data not shown). During the period of physical training, LP + T pups presented lower body weight than all other groups from 4th week until the end of experiments (Fig. 1A). Body weight gain was not different among groups (Fig. 1B).

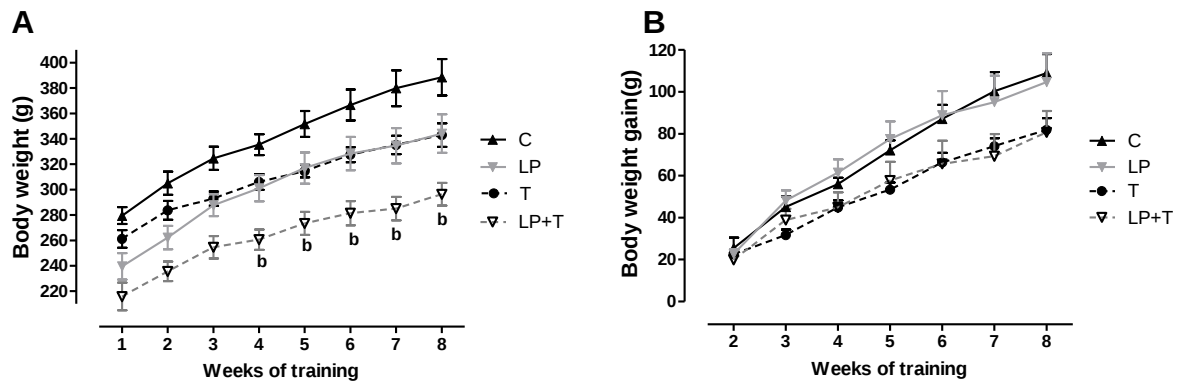


Figure 1. Body weight (A) and body weight gain (B) of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Pups were from mother's submitted either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP). Groups (n = 6 in each group) were: Control (C), Low-Protein (LP), Trained (T) and Low-Protein + trained (LP + T). Values express in Mean $\pm$ EPM ^b p <0.05 LP + T vs LP, using ANOVA two-way.

In response to resistance physical training, from the 6th week on, LP+T pups had a lower maximum overload capacity when compared to T animals. However, maximum overload relative to body weight was similar among groups (Fig. 2A and 2B).

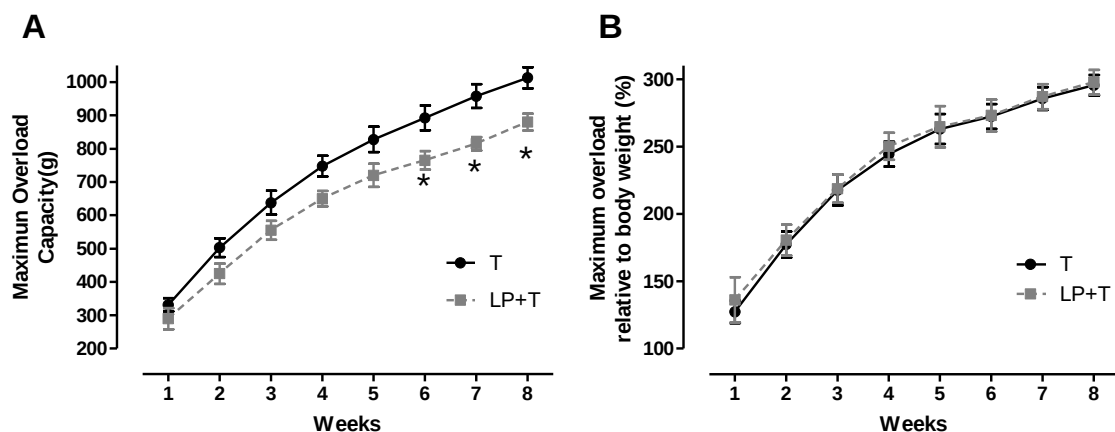


Figure 2. Maximum overload capacity (A) and relative maximum overload capacity of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Pups were from mother's submitted either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP). Groups (n = 6 in each group) were: Trained (T) and Low-Protein + trained (LP + T). Values express in Mean $\pm$ EPM. * p <0.05 LP + T vs T, using ANOVA two-way.

After the program of training, T pups had a lower serum glucose concentration than C pups. There were no differences in the biochemistry analyses and in the relative weight of organs in response to resistance physical training (Table 2).

Table 2. Serum biochemistry and relative weights of organs of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Pups were from mother's submitted either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP). Groups (n = 6 in each group). Values express in Mean $\pm$ EPM

	Control	Low protein	Trained	Trained+LP
Serum Biochemistry				
Cholesterol (mg/dL)	69.26 $\pm$ 11.03	64.06 $\pm$ 10.84	66.83 $\pm$ 9.17	63.35 $\pm$ 10.77
Triglycerides (mg/dL)	89.39 $\pm$ 45.84	85.35 $\pm$ 42.04	123.54 $\pm$ 36.1	125.76 $\pm$ 33.74
Glucose (mg/dL)	114.33 $\pm$ 14.5	115.35 $\pm$ 14.71	85.7 $\pm$ 13.21*	106.8 $\pm$ 11.6
Weights of Organs relative to body weight				
Cerebellum (g)	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.0	0.09 $\pm$ 0.02
Heart (g)	0.48 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.04
Right Kidney (g)	0.41 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02
Right Testicle (g)	0.44 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.02	0.5 $\pm$ 0.09

*p <0.05 vs. C group using ANOVA two-way.

Locomotor activity

Some parameters of locomotor activity were evaluated pre and post the period of physical training (Figure 3). The Control rats showed a standard evolution of locomotor activity represented by a decrease in distance traveled and the number of stops and an increase in the time of immobility and the time in each stop (Figure 3). LP pups showed no differences in values post-training when compared to pre-values in terms of distance traveled, number of stops, time of immobility and time in each stop. However, T and LP + T pups had the same standard evolution from the Control pups.

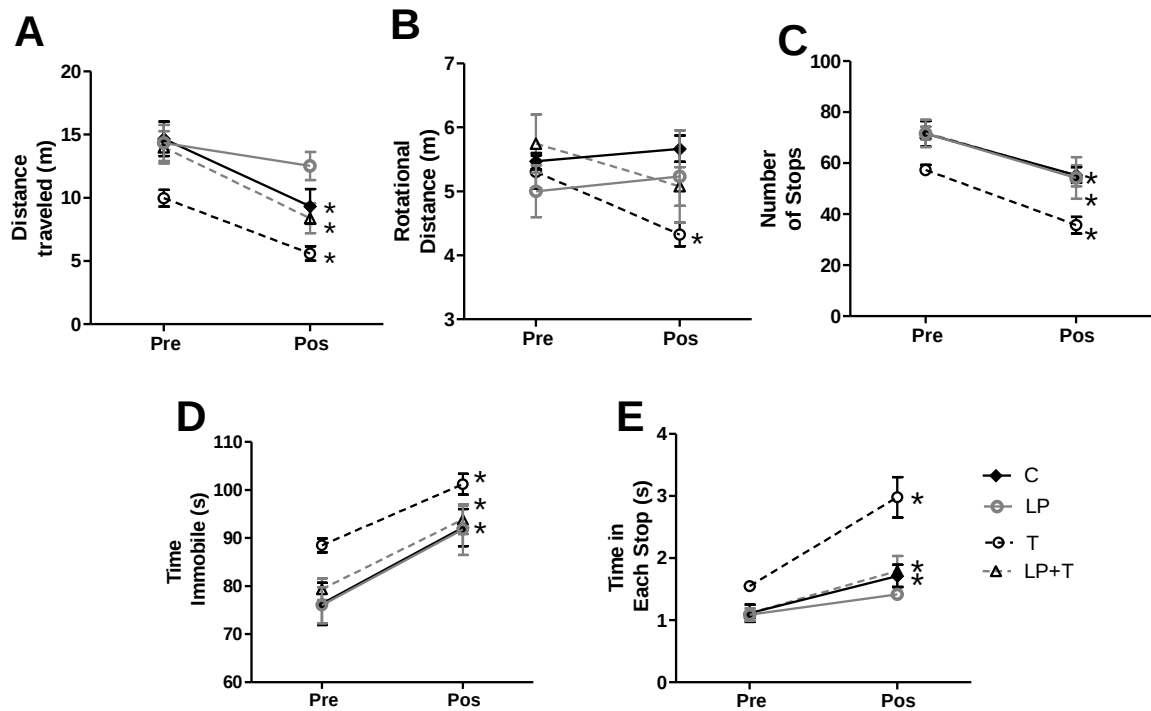


Figure 3. Parameters of locomotor activity evaluated pre and post resistance training program. At 60 days of life, half of pups from mothers submitted to either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP) were submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Groups (n = 6 in each group) were: Control (C), Low-protein (LP), Trained (T) and Low-Protein + trained (LP + T). Values express in Mean $\pm$ EPM. *p < 0.05 vs. Pre-training values using Paired T-test.

Regarding to the other parameters of locomotor activity, LP pups showed an increase in average speed at post-training similar as seen in the control pups, while in pups submitted to physical training (T and LP+T), the average speed remained as the same the pre-training values (Figure 4A). There was no change in the post-training maximum speed in all groups compared to pre-training (Figure 4B). Only T pups showed a decrease in the average potency following the resistance-training program (Figure 4C).

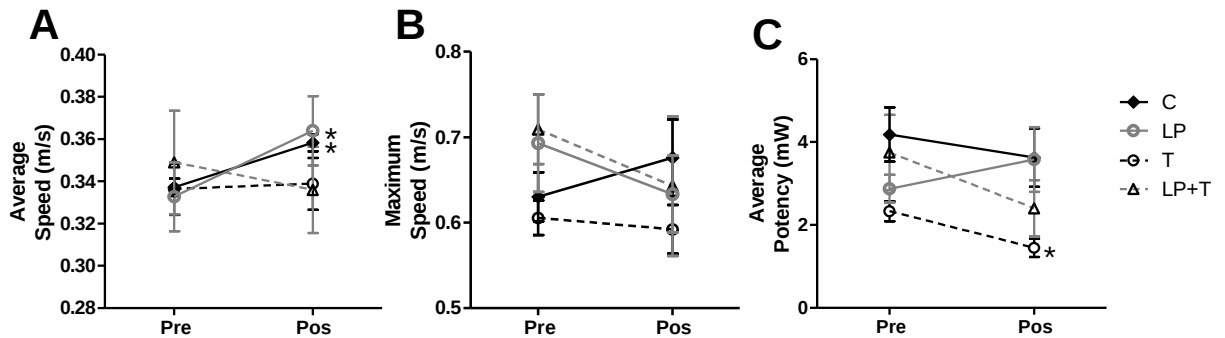


Figure 4. Pre and Pos mean values of parameters of average speed, maximum speed and average potency of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Pups were from mother's submitted either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP). Groups (n = 6 in each group) were: Trained (T) and Low-Protein + trained (LP + T). Values express in Mean $\pm$ EPM. *p < 0.05 vs. previous values using Paired T-test.

In comparison among groups after physical training, T pups showed a reduced average potency, number of stops and high time in each stop when compared to control pups. For LP + T pups, there were no differences in all variables when compared to control and LP pups, except for a reduction in the distance traveled when compared to LP pups (Table 3).

Table 3. Parameters of locomotor activity of pups submitted to a resistance physical training (8 weeks, 5 d/week). Pups were from mother's submitted either a control diet (C) or a low-protein diet during gestation and lactation (LP). Groups (n = 6 in each group). Values express in Mean $\pm$ EPM

	Control	Low protein	Trained	Low protein + Trained
Distance traveled (m)	9,3 $\pm$ 3,4	12,5 $\pm$ 2,7	5,6 $\pm$ 1,4	8,4 $\pm$ 2,8 ^b
Rotational distance (m)	5,8 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,7
Average speed (m/s)	0,4 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,05
Maximum Speed (m/s)	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2
Average potency (mW)	3,6 $\pm$ 1,7	3,6 $\pm$ 1,9	1,5 $\pm$ 0,5 ^a	2,4 $\pm$ 1,6
Time immobile(s)	92,2 $\pm$ 9,4	91,8 $\pm$ 12,9	101,2 $\pm$ 5,3	93,8 $\pm$ 7,3
Number of stops	55,3 $\pm$ 7,6	54,2 $\pm$ 20,0	35,7 $\pm$ 8,0 ^a	55,0 $\pm$ 10,0
Time in each stop (s)	1,7 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,8 ^a	1,8 $\pm$ 0,6

^a p < 0,05 vs C group and ^b p < 0,05 vs LP group using two way ANOVA.

Discussion

The capacity to generate force is determined by muscular mass, fibers proportion and ability to recruit fibers ²². It is well known that rats submitted to low protein diet during lactation present a reduction in the muscular mass even when analyzed proportionally to total

body weight^{23, 24}. In addition, animals submitted to a low-protein diet (casein 8%) during gestation and lactation showed an increase in the proportion of fast fibers (IIa in slow muscles and IIb in fast muscles)²⁵. In previous studies, when the tension was analyzed in isolated muscle, it was observed that low-protein animals (casein 8% during lactation) presented a higher force per muscle mass than control due to the enhanced proportion of type IIa and IIb fibers²³. All these effects can be attenuated by regular physical exercise as seen in previous studies^{12, 26}. In the present study, daily resistance physical training can induce benefits in the skeletal muscle. Low-protein trained pups presented the same response for the maximum overload capacity relative to their body weight. Thus, daily resistance physical training is an important tool in order to recovery the long-terms effects of a perinatal low protein diet on the morphology and physiology of skeletal muscle.

In the present study, we did not observe changes in the weight of heart, kidney and testes in the adult pups. Indeed, some organs are preserved from the effects of maternal low-protein diet, as seen in previous study²⁷. However, there was a reduction in the fasting plasma glucose in trained rats²⁸. Aligned with our data, previous studies have shown that the resistance training (4 sets of 8 jumps, 50 to 80% of body weight 30 seconds of intervals, during 10 weeks) reduces blood glucose (180.0 ± 21.9 mg/dL to 151.7 ± 19.6 mg/dL) in rats²⁹. The underlying mechanism can be related to the ability to increase the expression of muscle glucose transporter (GLUT4) and improve insulin sensitivity³⁰. Holten et al. (2004), showed an improvement in insulin action due to the increase of GLUT-4 expression, insulin receptor, protein kinase B and enzyme glycogen synthase after six weeks of resistance training³¹.

We evaluated the animals in an open field before (pre values) and after 8 weeks of a resistance training program (post values). As expected, control animals showed a reduction in the distance traveled and number of stops and an increase in time of immobility throughout the experiment. This response represents the reduction of the exploratory behavior age-related^{21, 32}. On the other hand, LP animals did not present this pattern of locomotion. It was already showed that low-protein diet during lactation affected the locomotor activity⁵. At the present study, perinatal low protein diet buffered the influence of age in locomotor activity. Interestingly, the resistance training program allowed the animals to evolve the normal pattern of locomotion, regardless maternal diet.

Potency is produced during displacement and refers to the amount of energy dissipated over time²¹. The mathematical expression includes the product of mass and square of velocity

per time ²¹. Comparing the results among groups after the eight weeks of resistance training program, trained animals showed reduced average potency and number of stops and an increase in the time in each stops. Trained animals showed a tendency to low body mass and average speed and this sum of tendencies can cause a significance results on the potency. Furthermore, some morphological features such as the proportion of type IIb muscle fibers, can also influence locomotor activity ²³. Thus, the shortest distance traveled can be associated to the high proportion of this type of muscle fiber in undernourished animals ¹². However, the locomotion test conducted in this study was a voluntary (without reinforcement) that suggests recruitment of other muscle fibers types (ex. type I and IIa fibers) ³³.

Conclusion

Eighth weeks of daily resistance training were enough to increase muscle force even in animals subjected to a perinatal hypoproteic diet. This nutritional manipulation can cause changes on locomotor activity. However, resistance training attenuates the effects of hypoproteic diet on locomotor activity. We believe that this response is related to biomechanical adaptations in the skeletal muscle.

Acknowledgments

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES) and State of Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE).

References

1. Tirosh O, Sangeux M, Wong M, Thomason P, Graham HK. Walking speed effects on the lower limb electromyographic variability of healthy children aged 7-16 years. *Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology*. 2013 Dec;23(6):1451-9.
2. Teulier C, Sansom JK, Muraszko K, Ulrich BD. Longitudinal changes in muscle activity during infants' treadmill stepping. *J Neurophysiol*. 2012 Aug 1;108(3):853-62.

3. Gramsbergen A, Geisler HC, Taekema H, van Eykern LA. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999 Feb 5;112(2):217-28.
4. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Jun;26(4):471-83.
5. Barros KM, Manhaes-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos RJ, Deiro TC, Cabral-Filho JE, et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional neuroscience*. 2006 Feb-Apr;9(1-2):99-104.
6. Gramsbergen A, Westerga J. Locomotor development in undernourished rats. *Behav Brain Res*. 1992 May 8;48(1):57-64.
7. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991;156:38-50; discussion -5.
8. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007 May;261(5):412-7.
9. West-Eberhard MJ. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2005 Nov 15;304(6):610-8.
10. de Melo Montenegro IH, Moita L, Dos Reis FK, de Oliveira E, Lisboa PC, de Moura EG, et al. Effects of a moderate physical training on the leptin synthesis by adipose tissue of adult rats submitted to a perinatal low-protein diet. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2012 Oct;44(11):814-8.
11. Fidalgo M, Falcao-Tebas F, Bento-Santos A, de Oliveira E, Nogueira-Neto JF, de Moura EG, 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. *The British journal of nutrition*. 2013 Feb 14;109(3):449-56.
12. Leandro CG, da Silva Ribeiro W, Dos Santos JA, Bento-Santos A, Lima-Coelho CH, Falcao-Tebas F, et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on

fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *European journal of nutrition*. 2012 Oct;51(7):807-15.

13. Moita L, Lustosa MF, Silva AT, Pires-de-Melo IH, de Melo RJ, de Castro RM, et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(2):103-10.
14. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2002 Feb;34(2):364-80.
15. Hornberger TA, Jr., Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquee*. 2004 Feb;29(1):16-31.
16. Aagaard P, Simonsen EB, Andersen JL, Magnusson P, Dyhre-Poulsen P. Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses. *J Appl Physiol*. 2002;92:2309-18.
17. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998 Mar;77(4):372-8.
18. Rockl KS, Hirshman MF, Brandauer J, Fujii N, Witters LA, Goodyear LJ. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):2062-9.
19. Bayne CG. American Academy of Home Care Physicians. Are you ready for this? *Home Care Provid*. 1996 May-Jun;1(3):162-3.
20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, 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*. 1993 Nov;123(11):1939-51.
21. Aragao S, Rodrigues MA, de Barros KM, Silva SR, Toscano AE, de Souza RE, et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. *Journal of neuroscience methods*. 2011 Feb 15;195(2):216-21.

22. Kernell D. Principles of force gradation in skeletal muscles. *Neural Plast.* 2003;10(1-2):69-76.
23. Toscano AE, Manhaes-de-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 2008 Mar;24(3):270-8.
24. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr.* 1996 Oct;76(4):591-603.
25. Leandro CG, da Silva Ribeiro W, Dos Santos JA, Bento-Santos A, Lima-Coelho CH, Falcao-Tebas F, et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *Eur J Nutr.* 2011 Oct 29.
26. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association.* 2007 Aug;21(3):751-6.
27. Toscano AE, Amorim MA, de Carvalho Filho EV, Aragao Rda S, Cabral-Filho JE, de Moraes SR, et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life sciences.* 2008 May 23;82(21-22):1131-6.
28. Sharp PE, LaRegina MC. *Experimental Methodology. The Laboratory Rat*: CRC Press; 1998.
29. Tavares RL, Toscano LT, Toscano LT, Aquino JdS, Silva AS. Resistance training reduces blood glucose in rats. *Nutrire.* 2015 1(40):63-70.
30. Hurley BF, Hanson ED, Sheaff AK. Strength training as a countermeasure to aging muscle and chronic disease. *Sports Med.* 2011 Apr 1;41(4):289-306.
31. Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF, Dela F. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004 Feb;53(2):294-305.

32. Ba A, Seri BV. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995 Fall;19(3):413-25.
33. Deschenes MR, Kraemer WJ, McCoy RW, Volek JS, Turner BM, Weinlein JC. Muscle recruitment patterns regulate physiological responses during exercise of the same intensity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Dec;279(6):R2229-36.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, um programa de treinamento de resistência diário foi desenvolvido para melhorar o desempenho e a força em ratos machos. O programa de treinamento de resistência foi baseado no desempenho em um teste de sobrecarga máxima semanal e realizado individualmente. Nossos dados mostraram que apenas 8 semanas de treinamento de resistência diário foram suficientes para aumentar a capacidade de sobrecarga máxima, a força e a proporção de fibra muscular glicolítica. No entanto, não houve alteração na expressão de genes de BDNF e de IGF-1 na medula espinal e do motor córtex. Um mecanismo adaptativo periférico pode produzir uma melhora nos movimentos coordenados e reduzir a influência central ou a interferência funcional fornecido pelo córtex motor e a medula espinal. Além disso, é possível que o treinamento de resistência aumente a produção de IGF-1 periférico e, conseqüentemente, provoque uma produção reduzida de IGF-1 pelo cerebelo.

Oito semanas de treinamento de resistência diário foram suficientes para aumentar a força muscular, mesmo nos animais submetidos a uma dieta hipoprotéica perinatal. Esta manipulação nutricional pode causar mudanças na atividade locomotora. No entanto, o treinamento de resistência atenua os efeitos da dieta hipoprotéica sobre a atividade locomotora. Acreditamos que essa resposta está relacionada com adaptações biomecânicas no músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AAGAARD, P. et al. Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses. **J Appl Physiol**, v. 92, p. 2309-2318, 2002.

ARAGAO RDA, S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. **J Neurosci Methods**, v. 195, n. 2, p. 216-21, Feb 15 2011.

BA, A.; SERI, B. V. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 19, n. 3, p. 413-25, Fall 1995.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-7, 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.

BAYNE, C. G. American Academy of Home Care Physicians. Are you ready for this? **Home Care Provid**, v. 1, n. 3, p. 162-3, May-Jun 1996.

BOTTINELLI, R. et al. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. **J Physiol**, v. 495 (Pt 2), p. 573-86, Sep 1 1996.

BOUET, V. et al. Development of the locomotor system in 2 G exposed rats. **J Gravit Physiol**, v. 11, n. 2, p. P165-6, Jul 2004.

BROOKE, MH; KAISER, KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23:369–379, 1970

BUSCHER, D.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. **Cell Tissue Res**, v. 296, n. 1, p. 131-9, Apr 1999.

CAMPOS, G. E. et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol**, v. 88, n. 1-2, p. 50-60, Nov 2002.

CARRO, E. et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. **J Neurosci**, v. 20, n. 8, p. 2926-33, Apr 15 2000.

DA-SILVA, A. T. et al. Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the northeast of Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 3-4, p. 383-92, 1987.

DE MELO MONTENEGRO, I. H. et al. Effects of a moderate physical training on the leptin synthesis by adipose tissue of adult rats submitted to a perinatal low-protein diet. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 11, p. 814-8, Oct 2012.

DESAI, M. et al. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Br J Nutr**, v. 76, n. 4, p. 591-603, Oct 1996.

DESCHENES, M. R. et al. Muscle recruitment patterns regulate physiological responses during exercise of the same intensity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 6, p. R2229-36, Dec 2000.

DOHERTY, P.; WALSH, F. S. The contrasting roles of N-CAM and N-cadherin as neurite outgrowth-promoting molecules. **J Cell Sci Suppl**, v. 15, p. 13-21, 1991.

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A.; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 77, n. 4, p. 372-8, Mar 1998.

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. 449-56, Feb 14 2013.

FINER, J. T.; SIMMONS, R. M.; SPUDICH, J. A. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. **Nature**, v. 368, n. 6467, p. 113-9, Mar 10 1994.

FREITAS-SILVA, S. R.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; PEROT, C. Is the maturation of monosynaptic stretch reflex in rats affected by neonatal malnutrition? **Nutr Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 207-12, Oct 2008.

FUNAKOSHI, H. et al. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1495-9, Jun 9 1995.

GARLAND, T., JR. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **J Exp Biol**, v. 214, n. Pt 2, p. 206-29, Jan 15 2011.

GEISLER, H. C.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of posture in the rat. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 53, n. 4, p. 517-23, 1993.

GOLDSHMIT, Y. et al. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 5, p. 449-65, May 2008.

GORSKA, T. et al. Recovery of overground locomotion following partial spinal lesions of different extent in the rat. **Behav Brain Res**, v. 196, n. 2, p. 286-96, Jan 23 2009.

GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 4, p. 547-53, Jul 1998.

GRAMSBERGEN, A. et al. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 112, n. 2, p. 217-28, Feb 5 1999.

GRAMSBERGEN, A.; VAN EYKERN, L. A.; MEEK, M. F. Sciatic nerve transection in adult and young rats: abnormal EMG patterns during locomotion. **Equine Vet J Suppl**, n. 33, p. 36-40, Apr 2001.

GRAMSBERGEN, A.; WESTERGA, J. Locomotor development in undernourished rats. **Behav Brain Res**, v. 48, n. 1, p. 57-64, May 8 1992.

GRIFFIN, L.; CAFARELLI, E. Resistance training: cortical, spinal, and motor unit adaptations. **Can J Appl Physiol**, v. 30, n. 3, p. 328-40, Jun 2005.

HOLM, L. et al. Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. **J Appl Physiol**, v. 105, n. 5, p. 1454-61, Nov 2008.

HOLTEN, M. K. et al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 294-305, Feb 2004.

HORNBERGER, T. A., JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

HURLEY, B. F.; HANSON, E. D.; SHEAFF, A. K. Strength training as a countermeasure to aging muscle and chronic disease. **Sports Med**, v. 41, n. 4, p. 289-306, Apr 1 2011.

ILHA, J. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-66, Jul-Aug 2008.

KERNEL, D. Principles of force gradation in skeletal muscles. **Neural Plast**, v. 10, n. 1-2, p. 69-76, 2003.

KRAEMER, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 2, p. 364-80, Feb 2002.

_____. Effects of a multi-nutrient supplement on exercise performance and hormonal responses to resistance exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 101, n. 5, p. 637-46, Nov 2007.

LEANDRO, C. G. et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **Eur J Nutr**, Oct 29 2011.

_____. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, v. 21, n. 3, p. 751-6, Aug 2007.

LEE, K. H. et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) ameliorates and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) exacerbates the effects of undernutrition on brain growth during early postnatal life: studies in IGF-I and IGFBP-1 transgenic mice. **Pediatr Res**, v. 45, n. 3, p. 331-6, Mar 1999.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, 1991.

MALTIN, C. A. et al. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 359-74, Sep 2001.

MOITA, L. et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 2, p. 103-10, 2011.

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. 471-83, Jun 2002.

NEEPER, S. A. et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res**, v. 726, n. 1-2, p. 49-56, Jul 8 1996.

PESTRONK GJ, KAISER KK, BROOKE MH. ATPase stain in muscle histochemistry. *Muscle Nerve* 15:258, 1992.

PU, S. F.; ZHUANG, H. X.; ISHII, D. N. Differential spatio-temporal expression of the insulin-like growth factor genes in regenerating sciatic nerve. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 34, n. 1, p. 18-28, Dec 1 1995.

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. 1939-51, Nov 1993.

ROCKL, K. S. et al. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2062-9, Aug 2007.

ROY, R. R.; WILSON, R.; EDGERTON, V. R. Architectural and mechanical properties of the rat adductor longus: response to weight-lifting training. **Anat Rec**, v. 247, n. 2, p. 170-8, Feb 1997.

SEGURA, B. et al. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. **Neurosci Lett**, v. 354, n. 3, p. 181-4, Jan 16 2004.

SEIFERT, T. et al. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, p. R372–R377, 2010.

SHARP, P. E.; LAREGINA, M. C. Experimental Methodology. In: (Ed.). **The Laboratory Rat**: CRC Press, 1998. (Laboratory Animal Pocket Reference). ISBN 978-0-8493-2565-6.

TAVARES, R. L. et al. Resistance training reduces blood glucose in rats. **Nutrire**, v. 1, n. 40, p. 63-70, 2015

TEULIER, C. et al. Longitudinal changes in muscle activity during infants' treadmill stepping. **J Neurophysiol**, v. 108, n. 3, p. 853-62, Aug 1 2012.

THOENEN, H. The changing scene of neurotrophic factors. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 5, p. 165-70, May 1991.

TIROSH, O. et al. Walking speed effects on the lower limb electromyographic variability of healthy children aged 7-16 years. **J Electromyogr Kinesiol**, v. 23, n. 6, p. 1451-9, Dec 2013.

TOSCANO, A. E. et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sci**, v. 82, n. 21-22, p. 1131-6, May 23 2008.

TOSCANO, A. E.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270-8, Mar 2008.

TRAPPE, S. et al. Single muscle fibre contractile properties in young and old men and women. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 1, p. 47-58, Oct 1 2003.

TZARFATI-MAJAR, V.; BURSTYN-COHEN, T.; KLAR, A. F-spondin is a contact-repellent molecule for embryonic motor neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 8, p. 4722-7, Apr 10 2001.

WAINWRIGHT, P. E.; COLOMBO, J. Nutrition and the development of cognitive functions: interpretation of behavioral studies in animals and human infants. **Am J Clin Nutr**, v. 84, n. 5, p. 961-70, Nov 2006.

WANNER, I. B. et al. Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. **Glia**, v. 54, n. 5, p. 439-59, Oct 2006.

_____. Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterize growing peripheral nerve fronts. **Glia**, v. 54, n. 5, p. 424-38, Oct 2006.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 304, n. 6, p. 610-8, Nov 15 2005.

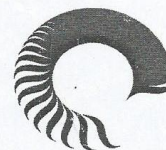
WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 57, n. 2, p. 163-74, Dec 15 1990.

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. 815-21, Apr 1988.

Anexo A - Parecer do comitê de ética

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, 31 de outubro de 2013.

Ofício nº 644/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Carol Virginia Góis Leandro**
Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Processo nº 23076.042017/2013-89

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, ***"Efeitos do Tratamento Físico de Força Sobre a Morfologia do Nervo Ciático e de Fibras Musculares e Sobre a Expressão de Fatores Neurotrópicos no Sistema Nervoso Central em Ratos Adultos Submetidos à Desnutrição"***.

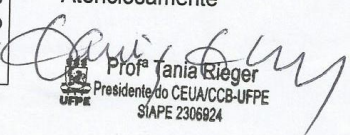
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

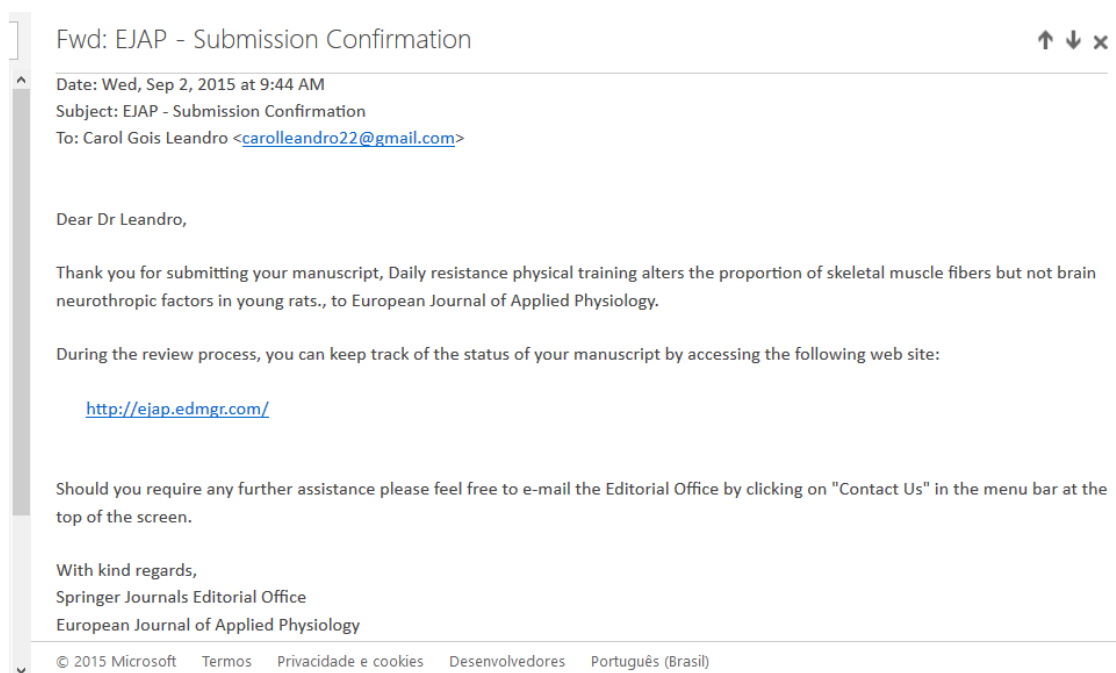
Origem dos animais: Biotério, Fazenda, Aviário Biotério de Criação do Departamento de Nutrição; Animal; Rato Heterogênico; Linhagem; Wistar; Idade; 60 dias; Peso; 250g; Sexo; macho e fêmea; Nº Total de Animais; 72

Atenciosamente


Prof.ª Tania Krieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306824

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo B - Comprovante de submissão do artigo 1



Anexo C - Comprovante de submissão do artigo 2

