



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

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS TIPOS DE FIBRAS
MUSCULARES DE ANIMAIS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NO PERÍODO
PERINATAL**

WELLINGTON DA SILVA RIBEIRO

RECIFE

2009



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

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS TIPOS DE FIBRAS
MUSCULARES DE ANIMAIS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NO PERÍODO
PERINATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia para obtenção do título de Mestre em Patologia. Orientador: Prof^o Dr Nicodemos Teles de Pontes Filho. Co-orientadoras: Prof^a Dr^a Carol Góis Leandro e Prof^a Dr^a Ana Elisa Toscano.

WELLINGTON DA SILVA RIBEIRO

RECIFE

2009

Ribeiro, Wellington da Silva.

Efeito do treinamento físico moderado nos tipos de fibras musculares de animais submetidos à desnutrição no período perinatal / Wellington da Silva Ribeiro – Recife : O Autor, 2009.

79 folhas : il., fig. e tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Treinamento físico – Programação fetal. 2. Desnutrição. 3. Fibras musculares – Modificação. I. Título.

796.015.572 CDU (2.ed.)
613.71 CDD (21.ed.)

UFPE
CCS2010-020



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmpp@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



AUTOR: WELLINGTON DA SILVA RIBEIRO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA DISSERTAÇÃO: “EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES DE ANIMAIS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NO PERÍODO PERINATAL”.

ORIENTADOR: PROF. DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

CO-ORIENTADORAS: PÓS-DOCTORA CAROL VIRGÍNIA GÓIS LEANDRO E DRA. ANA ELISA TOSCANO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 27 DE AGOSTO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

Hilton Justino

Prof.^a Pós-Doutora Sandra Lopes de Souza

Souza

Prof. Pós-Doutor Leonardo dos Reis Silveira

Leonardo dos Reis Silveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2009

DEDICATÓRIA

AO GRANDE ARQUITETO DO UNIVERSO

Essa é minha maior conquista até hoje, muitas outras com certeza virão, dedico todas, e sempre dedicarei exclusivamente a Deus, sem ele eu não teria conseguido aproveitar as oportunidades que aparecem em minha frente. Senhor obrigado por tudo, agradeço a cada dia as obras que o senhor constrói para mim.

Tudo Justo e Perfeito!

AGRADECIMENTOS

À Deus por TUDO.

A meu pai, Dr. Temístocles Ribeiro, por todo investimento, fé e esperança depositadas em mim. Tento sempre te dar alegrias e orgulho do que eu faço.

À minha família, D. Téia, Tel e San, pelo convívio e ajuda que sempre me oferecem nos momentos que mais preciso.

À minha esposa e mulher da minha vida Monialy por fazer parte da minha vida e compartilhar todas as etapas deste trabalho. Por me entender e me aceitar com todos os meus erros e defeitos. Amo você mais que tudo nessa vida

Ao meu filho Temístocles Neto (Netinho) por ter compreendido papai nos momentos de ausência. Tudo o que papai faz é pra tentar te dar uma vida melhor no futuro, tenho um amor incondicional por você.

Aos MEUS AMIGOS de experimento Adriano Bento (Caverna) e Carlos Henrique (Liminha), sem vocês a primeira etapa jamais seria concluída, obrigado pela dedicação. Antonio (Santos Et Al) com sua dedicação, esperteza e conhecimento em pesquisa, foi fundamental na segunda etapa, Taciana Coutinho (TC) que também foi fundamental na segunda etapa, com dedicação e responsabilidade, Amanda, amiga que conheci no multi-usuários, com sua “paciência” e vontade de trabalhar, obrigado a todos vocês por todas colaboração ao nosso trabalho.

À Iracema Pires-de-Melo, Marcos Fidalgo, Marcelus Almeida e Marcos André, todos vocês participaram da minha evolução pessoal e enquanto pesquisador, obrigado pelas palavras e ensinamentos.

À Carol Leandro a grande responsável por tudo que fiz, obrigado por todo conhecimento, obrigado por ter me oferecido uma formação com muita seriedade, responsabilidade, conhecimento científico e competência nas atividades. Obrigado por liderar nosso grupo com tanta maestria. Enfim, Obrigado!

À Ana Elisa pela dedicação e apoio ao nosso trabalho, todas as técnicas e uma boa base teórica que me foram oferecidas, pela paciência que lhe é peculiar, agradeço muito!

À Renata Campina , Thiago Luís e Carina Sacanonni, sem vocês eu não estaria apto à concluir essa dissertação.

Ao NNI – Núcleo de Nutrição Neuropsicofarmacologia e Imunidade, grupo de pesquisa que tenho orgulho de fazer parte e que constrói pesquisadores com responsabilidade e competência.

Ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, por disponibilizar instrumentos para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. França por todo conhecimento repassado sobre o cuidado com os animais de experimentação e pelas conversas e ensinamentos sobre a vida e a responsabilidade com a pesquisa.

Ao professor Nicodemos pessoa que aprendi a admirar durante todo decorrer da minha formação. O grade líder do nosso programa de pós-graduação que conduz tudo com muita responsabilidade e sem perder a simpatia que é marca da sua personalidade.

À Sandra Lopes, Hilton Justino, Leonardo Silveira, Raul Manhães-de-Castro e Ademar Afonso por terem aceito fazer parte da banca examinadora, tenho certeza que toda experiência e competência de todos vocês irá contribuir com nosso trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A nutrição como indutora de programação fetal	20
2.2 Influência da desnutrição sobre o desenvolvimento dos músculos	23
2.2.1 Morfogênese do músculo esquelético	23
2.2.2 Desnutrição perinatal e impactos na diferenciação de fibras durante o desenvolvimento.....	30
2.3 Treinamento físico e alterações no fenótipo de fibras musculares.....	31
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. HIPÓTESES	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Animais.....	42
5.2 Obtenção dos grupos experimentais	42
5.3 Protocolo de treinamento físico moderado.....	44
5.4 Avaliação do peso corporal e da taxa de crescimento	46
5.5 Análise histológica dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL)	46

5.6 Análise estatística	51
6. RESULTADOS	52
1ª PARTE – Efeito da dieta baixa em proteína sobre o ganho de peso durante a gestação e lactação e o peso ao nascer dos filhotes	53
2ª PARTE – Efeito do treinamento físico moderado sobre o ganho de peso corporal e a morfologia de fibras dos músculos sóleo e EDL dos filhotes	54
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS	71
ANEXO I – Parecer aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Ach** – Acetilcolina
- ATP** – Adenosina Trifostato
- ATPase** – Enzima catalizadora do ATP
- C** – Mães do grupo Controle
- CEEA** – Comissão de Ética em Experimentação Animal
- C_f** – Filhotes do grupo Controle
- CT_f** – Filhotes do grupo Controle Treinados
- D** – Mães do grupo Desnutrido
- D_f** – Filhotes do grupo Desnutrido
- DT_f** – Filhotes do grupo Desnutrido Treinados
- EDL** – Músculo Extensor Longo dos Dedos
- FC_{max}** – Frequência Cardíaca Máxima
- MHC** – Cadeia Pesada de Miosina
- pH** – Potencial Hidrogeniônico
- VO_{2max}** – Consumo Máximo de Oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Formação dos somitos no embrião humano aos 20 dias.....	23
Figura 02 – Formação dos miotubos a partir dos mioblastos.....	24
Figura 03 – Miofibrilas organizadas em sarcômeros	25
Figura 04 - Componentes estruturais do músculo esquelético	26
Figura 05 – Formação de fibras musculares primárias e secundárias	26
Figura 06 – Representação da miosina.....	27
Figura 07 – Fotomicrografia de corte transversal do músculo sóleo de ratos.....	29
Figura 08 – Desenho experimental da manipulação nutricional das mães durante a gestação e lactação	43
Figura 09 (A/B) – Ilustração de um corte transversal do músculo EDL e do músculo Sóleo em pH 4,55	47
Figura 10 A – Ilustração da análise dos tipos de fibras através do software Mensurim Pro 3.2. Músculo EDL em pH 4,3 e em pH 4,55	48
Figura 10 B - Ilustração da análise dos tipos de fibras através do software Mensurim Pro 3.2. Músculo Sóleo em pH 4,3 e em pH 4,55.....	49
Figura 11 – Ganho de peso corporal durante a gestação de ratas controle e submetidas à dieta baixa em proteína.....	52
Figura 12 – Peso corporal dos animais (A) e percentual do ganho de peso corporal (B) a partir dos 60 dias de idade	54
Figura 13 A – Cortes transversais dos músculos EDL e sóleo pré-incubados a um pH de 4,3 de cada grupo experimental.....	55
Figura 13 B – Gráficos dos valores percentuais a partir da contagem total de fibras nos cortes.....	56
Figura 14 A – Cortes transversais dos músculos EDL e sóleo pré-incubados a um pH de 4,55 de cada grupo experimental.....	58
Figura 14 B – Gráficos dos valores percentuais a partir da contagem total de fibras nos cortes.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição das dietas (controle, 17% e baixa em proteína, 8%)	42
Tabela 02 – Descrição do protocolo de treinamento físico moderado de acordo com a velocidade, inclinação e duração de cada sessão durante oito semanas de treinamento	44
Tabela 03 – Efeito da dieta baixa em proteína sobre a taxa de crescimento (g/dia) dos filhotes durante a lactação, do 22º ao 30º dia de vida e do 31º ao 60º dia de vida.....	53

RESUMO

Insultos ocorridos em um período crítico no início da vida, como na gestação e/ou lactação, atuam como fator de impressão e podem repercutir em alterações fisiológicas na idade adulta, estabelecendo o futuro estado metabólico e hormonal da progênie, sendo este efeito denominado “programação”. A desnutrição materna parece reduzir a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares do feto em desenvolvimento. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito do treinamento físico moderado na morfologia de fibras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de animais submetidos à desnutrição por dieta baixa em proteína durante a gestação e lactação. Ratos machos Wistar (60 dias de idade) provindos de mães desnutridas durante a gestação e lactação (8% de caseína, n=5) ou controle (17% caseína, n=5), foram divididos em 4 grupos: controle (C_f , n=6), desnutrido (D_f , n=6), controle treinado (CT_f , n=6) e desnutrido treinado (DT_f , n=6). O programa de treino consistiu em 8 semanas, 5 dias/semana, 60 min/dia a 70% do VO_{2max} . O peso corporal e a taxa de crescimento foram avaliados diariamente durante o experimento. Após o período de treinamento, os músculos sóleo e EDL foram retirados para análise histológica dos tipos de fibras pelo técnica de ATPase. Os animais D_f apresentaram uma diminuição de 60% na taxa de crescimento até os 60 dias de idade. A partir dos 60 dias, o grupo D_f apresentou um aumento no ganho de peso corporal. No músculo EDL, o grupo CT_f apresentou um aumento do percentual de fibras do Tipo IIa ($CT_f = 68,8 \pm 0,7$; $C_f = 59,5 \pm 1,1$; $p < 0,05$) e uma diminuição no percentual de fibras do Tipo IIb ($CT_f = 32,2 \pm 0,6$; $C_f = 36,7 \pm 1,1$; $p < 0,05$). Este mesmo resultado ocorreu para o grupo DT_f quando comparado ao seu controle D_f . No músculo sóleo, o grupo D_f apresentou uma diminuição no percentual de fibras do tipo I ($D_f = 77,8 \pm 0,5$; $C_f = 83,1 \pm 0,5$; $p < 0,05$) e um aumento no percentual de fibras do tipo IIa ($D_f = 19,0 \pm 0,4$; $C_f = 12,9 \pm 0,4$; $p < 0,05$). Os animais do grupo DT_f apresentaram um aumento no percentual de fibras do tipo I ($80,3 \pm 0,7$) e uma diminuição no percentual de fibras do tipo IIa ($17,2 \pm 0,7$) quando comparados ao grupo D_f . Em conclusão, a desnutrição hipoprotéica durante a gestação e lactação tem efeito programador na proporção dos tipos de fibras musculares nos animais adultos. O treinamento físico moderado pode atuar como estímulo ambiental para as mudanças fenotípicas em fibras de músculos mantendo a proporção de fibras oxidativas e afetando minimamente a proporção de fibras glicolíticas mesmo em animais programados pela desnutrição.

Palavras-chave: Programação fetal, miogênese, fibras musculares, exercício físico, ratos.

ABSTRACT

The main goal of the present study was to verify the effects of physical training on the morphology of *soleus* and *extensor digitorius longus* (EDL) muscles from animals submitted to a low-protein diet during gestation and lactation. Male Wistar rats (60 days old) pups from dams submitted to either a low protein diet (8% casein, n=5) or a control diet (17% casein, n=5), were divided into 4 groups: control (C_f , n=6), low-protein diet (D_f , n=6), control trained (CT_f , n=6) and low-protein diet trained (DT_f , n=6). Trained rats run in a treadmill for 8 weeks (5 days/week, 60 min/day at 70% do VO_{2max}). Body weight and growth rate were daily recorded throughout the experiment. After the period of training, soleus and EDL were removed for histological analysis by ATPase activity. D_f animals showed a reduction of 60% in the growth rate to 60th day old age. Then, these animals showed a higher gain of body weight when compared to control. In the EDL muscle of C_f group, there was an increase of the percentage of type IIa fiber ($CT_f = 68,8 \pm 0,7$; $C_f = 59,5 \pm 1,1$; $p < 0,05$) and a reduction in the percentage of type IIb fiber ($CT_f = 32,2 \pm 0,6$; $C_f = 36,7 \pm 1,1$; $p < 0,05$). Similarly, DT_f group showed the same results when compared to D_f . In the soleus muscle, D_f group showed a reduction in the percentage of type I fibers ($D_f = 77,8 \pm 0,5$; $C_f = 83,1 \pm 0,5$; $p < 0,05$), and an increase in the percentage of type IIa fibers ($D_f = 19,0 \pm 0,4$; $C_f = 12,9 \pm 0,4$; $p < 0,05$). DT_f group showed an increase in the percentage of type I fibers ($80,3 \pm 0,7$), and a reduction in the percentage of type IIa fibers ($17,2 \pm 0,7$) when compared to D_f . In conclusion, a low-protein diet during gestation and lactation can program the proportion of muscle fibers in adult animals. Moderate physical training acts as an environmental stimulus for phenotypic shifts in the muscle fibers by increasing the proportion of oxidative fibers and affecting the proportion of glycolytic fibers in programmed undernutrition animals.

Key-words: Fetal programming, myogenesis, muscle fiber, physical exercise, rats.

1. INTRODUÇÃO

Uma alimentação balanceada é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento do organismo. A falta ou deficiência de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças metabólicas associadas à obesidade (DESAI *et al.*, 1995; BARKER, 1999; DE MOURA e PASSOS, 2005; BARKER, 2007; DE MOURA *et al.*, 2007). Sabe-se que insultos ocorridos em um período crítico no início da vida, como na gestação e/ou lactação, atuam como fator de impressão e podem repercutir em alterações fisiológicas na idade adulta, estabelecendo o futuro estado metabólico e hormonal da progênie, sendo este efeito denominado “*programação*” (LUCAS, 1991).

De acordo com estudos epidemiológicos, o resultado de alterações no início da vida, como o baixo peso ao nascer ou desnutrição infantil, é o maior risco de desenvolver doenças na vida adulta (BARKER, 2007). Em animais, estudos vêm testando a hipótese da “origem fetal” ou “programação” através da desnutrição materna na gestação. O nosso grupo tem observado que a desnutrição no período neonatal altera o crescimento somático, a resposta ao tratamento com antidepressivos, o comportamento agressivo, o comportamento alimentar, a morfologia da laringe, as propriedades mecânicas do músculo esquelético, a morfologia do músculo cardíaco e o padrão de atividade locomotora de ratos adultos (BARROS *et al.*, 2006; BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2007; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2008; PIRES-DE-MELO *et al.*, 2009).

A desnutrição no período crítico do desenvolvimento está associada ao aparecimento de resistência à insulina e da diabetes tipo 2 (BARKER, 2007). Estudos epidemiológicos demonstram que os efeitos da programação fetal na composição corporal estão associados ao aumento do percentual de gordura corporal e a redução na massa muscular na vida adulta (KENSARA *et al.*, 2005). A redução na massa muscular está associada ao

número de fibras musculares que é fixado, na maioria das espécies, durante o período de gestação (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999).

Em humanos, os músculos são formados antes do nascimento, no início da embriogênese (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Há um aumento do número de miotubos e fibras musculares até a 25ª semana de gestação (MALTIN *et al.*, 2001). A seguir, a proliferação se torna mais lenta e pode cessar no momento do nascimento (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Em ratos, o desenvolvimento de fibras primárias ocorre no 14º ao 16º dia de vida fetal, e fibras secundárias no 17º ao 19º dia de vida fetal (WILSON *et al.*, 1988), embora diferenças no desenvolvimento dos diferentes tipos de músculos provavelmente existam. A desnutrição materna parece reduzir a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares do feto em desenvolvimento (BRAMELD, 2004). Contudo, o tipo de desnutrição e a restrição de um componente específico (por exemplo, quantidade de proteína) parecem ser determinantes no efeito programador da nutrição. Poucos estudos têm examinado o efeito da desnutrição materna durante a gestação e lactação ou componentes específicos da dieta (ex. conteúdo de proteínas) e as repercussões na vida adulta do filhote.

Tem sido especulado que alterações no crescimento e desenvolvimento de fibras musculares podem ser um dos mecanismos subjacentes à programação fetal de doenças metabólicas (FAHEY *et al.*, 2005a). Neste sentido, a morfologia do músculo esquelético pode atuar na patogênese da resistência à insulina uma vez que indivíduos obesos e diabéticos apresentam maior quantidade de fibras glicolíticas (tipo IIa e IIb) e menor quantidade de fibras oxidativas (tipo I) (TANNER *et al.*, 2002). Em ratos, a desnutrição durante a gestação aumentou a proporção de fibras do tipo I e reduziu a proporção de fibras do tipo II no músculo sóleo de filhotes jovens (MALLINSON *et al.*, 2007).

A hipertrofia das fibras musculares ocorre no período pós-natal e é sensível às alterações ambientais (BRAMELD, 2004). O grau de plasticidade também ocorre após o nascimento, e as fibras lentas podem se tornar rápidas e as fibras rápidas podem se tornar lentas nos músculos lentos (GOUBEL, 1997). O mecanismo subjacente às alterações no fenótipo das fibras ainda está pouco entendido, entretanto, estudos correlacionando o treinamento físico e mudanças no tipo de fibras tem sido publicados (ALMEIDA-SILVEIRA *et al.*, 1996; CORNU *et al.*, 1997; ALLAF *et al.*, 2002; LAMBERTZ *et al.*, 2003).

A depender do tipo, duração, intensidade e frequência do esforço, o treinamento físico pode alterar os tipos de fibras em um determinado músculo submetido ao exercício físico. O treinamento físico intenso (2h/dia, 5 dias por semana, 30m/min, durante 5 semanas) aumentou a expressão da cadeia pesada de miosina no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos que sofreram degeneração por toxina (BIGARD *et al.*, 1999). Em humanos, um treinamento progressivo de resistência de força durante 8 semanas aumentou o percentual de fibras do tipo IIa (transformação de fibras IIb para IIa) no músculo vasto lateral (JENSEN *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que o fenótipo do músculo é sensível às alterações ambientais, particularmente ao nível de aptidão física durante o desenvolvimento.

Desta forma, e uma vez que as fibras musculares, quando sujeitas a um estímulo de natureza crônica, parecem sensíveis a um conjunto de adaptações, o papel do treinamento físico moderado e regular sobre a proporção de fibras musculares de animais desnutridos parece ser de interesse. A utilização de um modelo de desnutrição baixa em proteína no período que envolve a proliferação e hipertrofia de células musculares (gestação e lactação, respectivamente) pode esclarecer ou suscitar novos questionamentos a respeito do impacto que o treinamento físico pode exercer em animais programados pela desnutrição e no estudo da origem fetal de doenças metabólicas da vida adulta.

Tendo em consideração o anteriormente exposto, este estudo teve como objetivo verificar o efeito do treinamento físico moderado na morfologia de fibras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de animais submetidos à dieta baixa em proteína durante a gestação e lactação. Para tanto, em ratos treinados e controles, submetidos ou não à dieta baixa em proteína, foram analisados os seguintes parâmetros: (1) taxa de crescimento dos filhotes; (2) ganho de peso corporal durante o protocolo de treinamento físico; e a (3) proporção de fibras musculares nos músculos sóleo e EDL. Nossa hipótese é que a desnutrição diminui a proporção de fibras oxidativas (tipo I) e aumenta a proporção de fibras glicolíticas (tipo IIa e IIb). O treinamento físico moderado, por sua vez, atenua os impactos da desnutrição mantendo a proporção de fibras oxidativas e afetando minimamente a proporção de fibras glicolíticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A nutrição como indutora de programação fetal

Uma alimentação balanceada é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento do organismo. A falta ou deficiência de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, durante a gestação e lactação, tem repercussões a curto e longo prazo (LUCAS, 1994). O termo “programação” é utilizado para descrever o processo pelo qual um estímulo ou insulto, quando aplicado no período crítico do desenvolvimento, tem efeitos permanentes sobre a estrutura e funções do organismo (LUCAS, 1991).

A relação entre a nutrição no período perinatal e a repercussão na vida adulta tem sido reconhecida há várias décadas. Em 1962, McCance manipulou o tamanho de ninhadas de forma que ratos de grandes ninhadas receberam menos leite materno quando comparados aos seus pares de ninhadas menores. Após o período de lactação, ambos os grupos foram alimentados com dieta equilibrada. Os ratos provindos de grandes ninhadas apresentaram menor ganho de peso corporal e redução na taxa de crescimento. Foi assim demonstrado que o tamanho e a trajetória de crescimento de ratos estavam relacionados ao seu estado nutricional no período de lactação. Foi também demonstrado que a manipulação da dieta após a lactação não induziu qualquer efeito a longo-prazo nos animais. Dessa forma, surgiu a idéia de uma janela crítica temporal para o crescimento e desenvolvimento que pode ser programada pela nutrição (MCCANCE, 1962).

Uma vez reconhecido o papel dos nutrientes no crescimento e desenvolvimento, o estado nutricional de indivíduos, especialmente a desnutrição, se tornou o alvo dos estudos. Em 1964, Dobbing formulou a hipótese do “período crítico do desenvolvimento”, observando efeitos irreversíveis da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento do cérebro de ratos

(DOBBING, 1964). De acordo com a ontogênese de cada fase (gestação, lactação ou primeira infância) e da espécie a ser estudada, a janela crítica do desenvolvimento pode se abrir e a falta ou excesso de nutrientes pode induzir alterações permanentes na estrutura e função de órgãos e sistemas. Em ratos, a desnutrição no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, que é o período de lactação, induz efeitos permanentes sobre o tamanho do cérebro, número de neurônios, comportamento, aprendizagem e memória (COSTA-CRUZ *et al.*, 2006; DO MONTE-SILVA *et al.*, 2007). O nosso grupo tem observado que a desnutrição no período neonatal altera o crescimento somático, a resposta ao tratamento com antidepressivos, o comportamento agressivo, o comportamento alimentar, as propriedades mecânicas do músculo esquelético, a morfologia do músculo cardíaco e o padrão de atividade locomotora de ratos adultos (BARROS *et al.*, 2006; BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2007; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2008a; TOSCANO *et al.*, 2008b).

Em humanos, estudos epidemiológicos demonstram que a desnutrição no período fetal ou neonatal pode programar o indivíduo para um aumento ou preservação dos estoques de gordura corporal ao longo da vida (RAVELLI *et al.*, 1976; BARKER *et al.*, 1989). Estudos recentes nos países em desenvolvimento evidenciaram que os distúrbios no crescimento associados à desnutrição são paradoxalmente relacionados ao aumento do índice peso/altura (SAWAYA *et al.*, 2004). No Brasil, foi investigada a prevalência de obesidade e desnutrição em 535 famílias (2.411 indivíduos) de uma zona de baixa renda na cidade de São Paulo (SAWAYA *et al.*, 1995). Neste estudo, houve 30% de prevalência de desnutrição infantil. A prevalência de obesidade foi de 6,4% em rapazes e de 8,7% em moças. A associação entre sobrepeso e deficiência no crescimento foi de 5,8% em rapazes e 6,8% para moças, ocorrendo relação forte entre peso/altura infantil e sobrepeso no adulto (SAWAYA *et al.*, 1995).

Resultados similares com crianças da zona rural e periferias urbanas do Brasil foram publicados (SICHERI *et al.*, 1993; FLORENCIO *et al.*, 2003).

Em animais, estudos com ratos sobre a desnutrição fetal têm demonstrado que fetos de mães submetidas à dieta hipoprotéica apresentam alterações metabólicas a curto e longo-prazo (BERNEY *et al.*, 1997; LESAGE *et al.*, 2002; OZANNE *et al.*, 2003). Um modelo animal de estudo bem estabelecido é fornecer às mães uma dieta normoprotéica (18% a 20% de proteína, caseína) ou uma dieta hipoprotéica (7% a 8% de proteína, caseína), e no período de lactação ou no desmame, os filhotes começam a receber dieta padronizada (CRIPPS *et al.*, 2007; COTTRELL e OZANNE, 2008; MARTIN-GRONERT *et al.*, 2008). Em um estudo com modelo de desnutrição protéica no período gestacional, foi verificado que a apoptose de células- β estava aumentada no pâncreas dos neonatos aos 14 dias de vida (PETRIK *et al.*, 1999). Em ratos machos, a restrição de proteína na dieta alterou o desenvolvimento reprodutivo aos 70 dias de idade (ZAMBRANO *et al.*, 2005). Em ratos adultos (135 dias de idade) submetidos a uma dieta hipoprotéica (8% de caseína) durante o período pré e pós-natal, foi observada uma deficiência na estrutura dos rins e menor pressão arterial média quando comparados aos seus pares normoprotéicos (20% de caseína) (HOPPE *et al.*, 2007).

O músculo, que tem um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, tem também sido alvo de estudos sobre programação perinatal. O músculo sóleo de ratos aos 15 meses de idade e que foram submetidos à desnutrição fetal apresenta menor sensibilidade à insulina quando comparado ao controle normoprotéico (OZANNE *et al.*, 2003). A desnutrição durante a gestação parece reduzir a taxa de crescimento e o número de fibras musculares na vida adulta (BRAMELD, 2004). O baixo peso ao nascer foi associado com um aumento de 66% de fibras do tipo IIb e uma diminuição de

22% de fibras IIa no músculo vasto lateral de jovens aos 19 anos (JENSEN *et al.*, 2007). Ratos jovens (4 semanas de vida), que sofreram desnutrição protéica durante a gestação, apresentam uma redução no número e na densidade de fibras musculares (MALLINSON *et al.*, 2007). Bayol *et al.* (2004) encontraram uma redução no número de núcleos dos músculos semitendinoso e gastrocnêmio indicando uma diminuição na proliferação celular em ratos jovens que sofreram restrição de dieta no período de gestação (40% da dieta consumida pelos controles).

Os músculos se desenvolvem em tempos diferentes com o número de fibras em alguns músculos sendo fixadas no período pós-natal (BRAMELD, 2004). Em ratos, a restauração de uma dieta equilibrada durante o período de lactação restabeleceu a redução no número de fibras dos músculos *lumbricais*, mas não do sóleo (WILSON *et al.*, 1988). Assim, o período crítico de desenvolvimento é determinante para o aparecimento de alterações persistente no tipo e na morfologia do músculo esquelético. Da mesma forma, o período em que o organismo sofreu insultos nutricionais pode causar alterações na proporção dos tipos de fibras em um músculo na vida adulta.

2.2 Influência da desnutrição sobre o desenvolvimento do músculo esquelético

2.2.1 Morfogênese do músculo esquelético

Em humanos, os músculos são formados antes do nascimento, no início da embriogênese (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Células miogênicas são originadas precocemente a partir do epiblasto, antes mesmo da formação dos somitos [Figura 1]. O mesoderma somítico apresenta a expressão de genes regulatórios miogênicos

(BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Esses genes codificam fatores regulatórios miogênicos, como: *Myo D*, *miogenina*, *myf-5* e *myf-6* envolvidos diretamente na formação dos músculos (COSSU *et al.*, 1996). A proliferação celular inicia-se então nos somitos sob a influencia das activinas A e B (COSSU *et al.*, 1996).

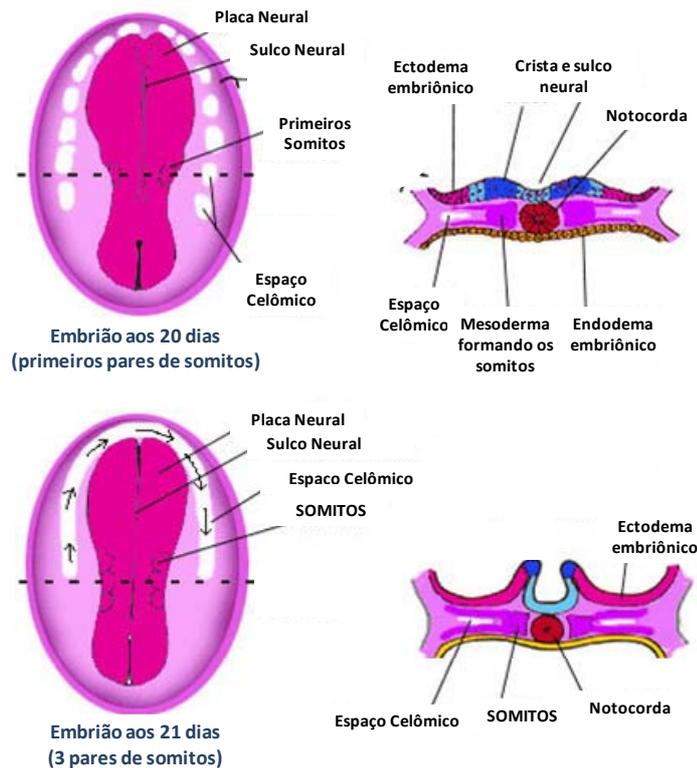


Figura 1: Formação dos somitos no embrião humano aos 20 dias. As células na zona equatorial da blástula tornam-se mesoderma e se posicionam no eixo dorsoventral. Após a gastrulação as células dorsais originarão a notocorda e o músculo esquelético. O músculo esquelético é derivado dos somitos.

A proliferação continua nos mioblastos sob regulação de proteínas expressas principalmente pelo fator de regulação miogênico *Myo D* (FAHEY *et al.*, 2005b). Estes mioblastos imaturos apresentam núcleo centralmente localizado e a membrana plasmática isenta de receptores para acetilcolina (Ach) (COSSU *et al.*, 1996). Seguindo o período de mitose proliferativa, os mioblastos se fundem para formar os miotubos [Figura 2].

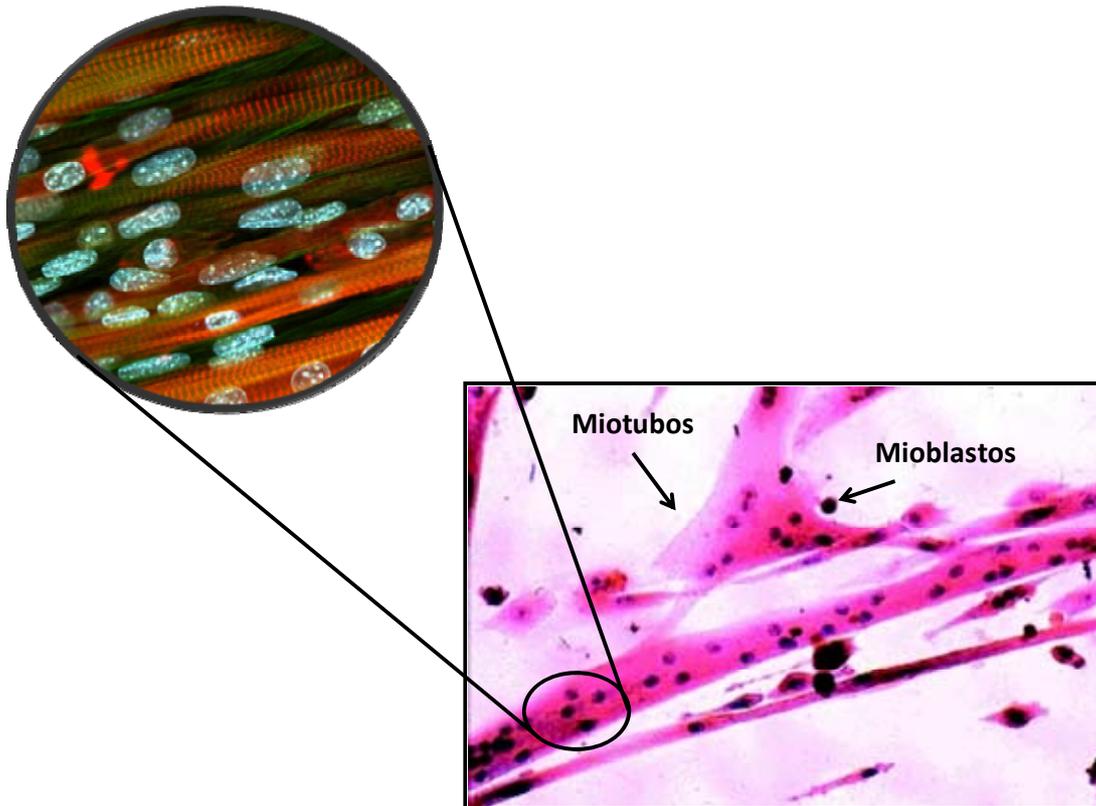


Figura 2: Formação dos miotubos a partir dos mioblastos. Nos mioblastos, os núcleos estão centralmente localizados. Nos miotubos, os núcleos migram para periferia.

A entrada de Ca^{+2} nos mioblastos é essencial para o processo de fusão, e nesta etapa os receptores de Ach estão expressos na membrana plasmática dos mioblastos (FAHEY *et al.*, 2005b). A seguir o processo de fusão, as proteínas dos miofilamentos (actina e miosina) são sintetizadas pelos polissomos. Os miofilamentos são agrupados em feixes, originando as faixas A e I, e subsequentemente as linhas Z são identificadas [Figura 3]. O arranjo ordenado das miofibrilas é responsável pelas estriações transversais, decorrentes da organização das proteínas contráteis em unidades idênticas, os sarcômeros, que constituem a unidade contrátil fundamental da fibra muscular (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). As proteínas identificadas nesta etapa são: desmina, titina, actina, cadeia pesada de miosina e nebulina [Figura 3].

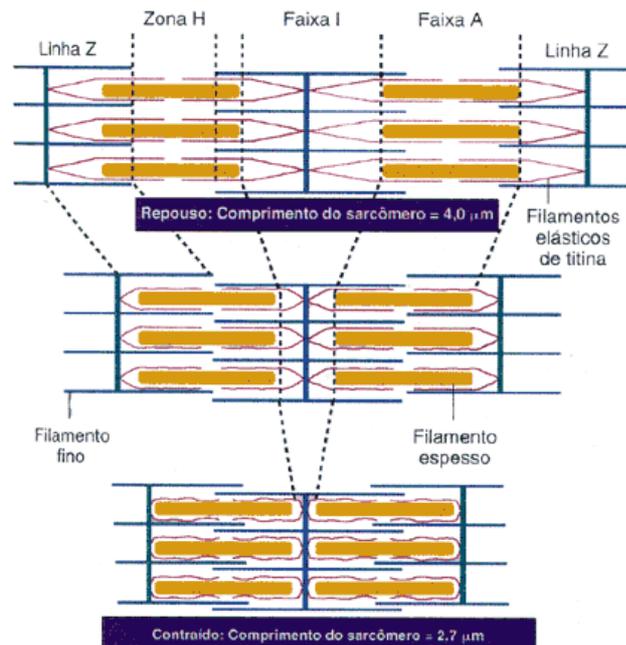


Figura 3: Miofibrilas organizadas em sarcômeros. Observa-se na faixa I, os filamentos finos de actina. Na faixa A, predomina os filamentos de miosina. As linhas Z delimitando a unidade funcional de uma fibra muscular e os filamentos elásticos de titina se encontram entre a linha Z e os filamentos de miosina.

A seguir a formação dos miotubos, o sistema tubular transverso é formado a partir de invaginações da membrana plasmática que se torna mais permeável ao K^+ e a ação da Ach. O núcleo se move para o citoesqueleto e os miotubos completam sua transição para uma fibra muscular. As fibras formam blocos de tecidos e dividem-se para formar os músculos. Cada músculo é envolvido em tecido conjuntivo que desemboca nos tendões no final do músculo, bem como, uma camada fibrosa que envolve as fibras musculares formando os fascículos (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999) [Figura 4].

Sucessivas populações de fibras musculares contêm diferentes miosinas. Os miotubos primários contêm miosina “lenta” e são dependentes de estímulo nervoso. A seguir, os miotubos secundários apresentam miosina “rápida” (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Durante o processo da miogênese, alguns mioblastos não se fundem e permanecem

quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo denominados de células satélites ou mioblastos adultos indiferenciados [Figura 5].

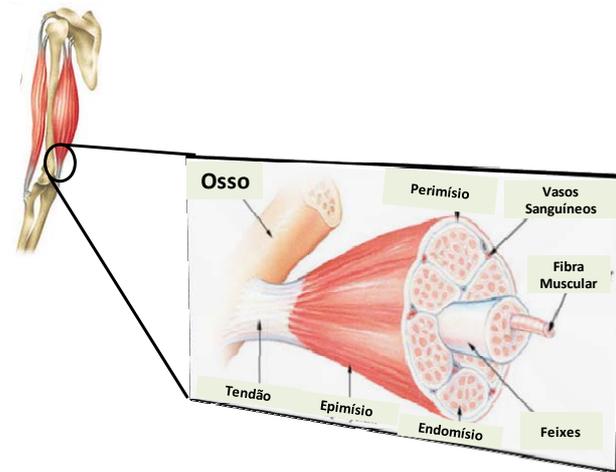


Figura 4: Componentes estruturais do músculo esquelético. Endomísio tecido conjuntivo que envolve miofibrilas. Perimísio, tecido conjuntivo que envolve os feixes. Epimísio, tecido conjuntivo que envolve o músculo e afunilam para formar os tendões.

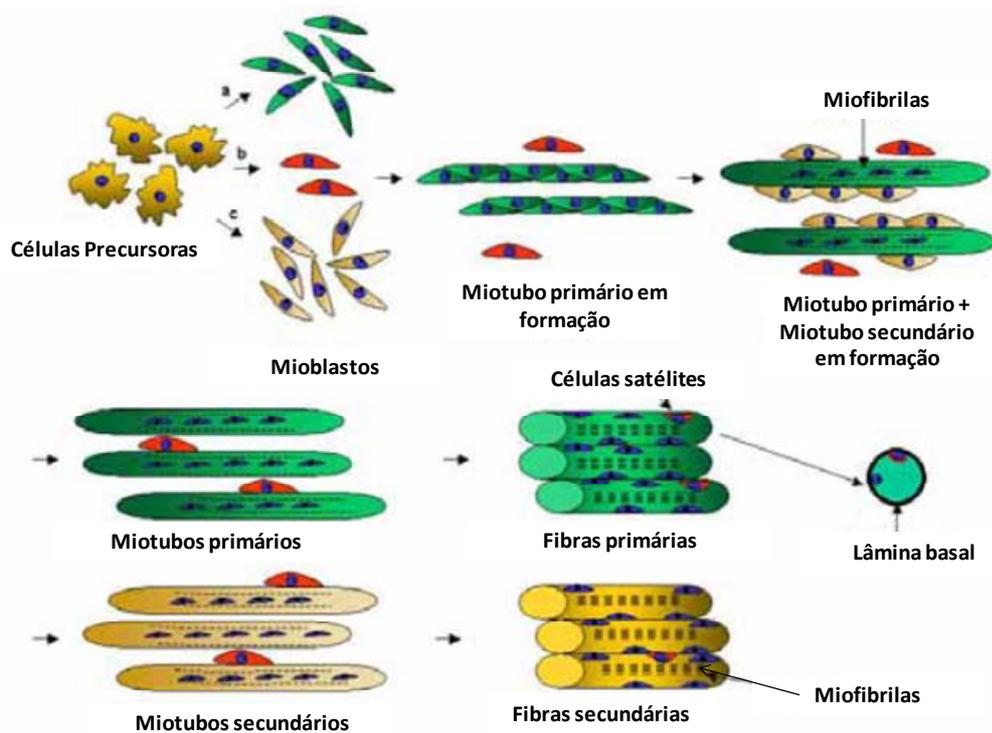


Figura 5: Formação de fibras musculares primárias e secundárias. Os miotubos primários fornecem suporte para os miotubos secundários. Células satélites são mioblastos quiescentes e permanecem entre a membrana plasmática e a lâmina basal das fibras.

Em humanos, existe um aumento do número de miotubos e fibras musculares até a 25ª semana de gestação (MALTIN *et al.*, 2001). A seguir, a proliferação se torna mais lenta e pode cessar no momento do nascimento (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Em ratos, o desenvolvimento de fibras primárias ocorre do 14º ao 16º dia de vida fetal, e fibras secundárias no 17º ao 19º dia de vida fetal (WILSON *et al.*, 1988), embora diferenças no desenvolvimento dos diferentes tipos de músculos provavelmente existam.

Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (BROOKE e KAISER, 1970). Três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIa e IIb, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina (ATPase miofibrilar ou m-ATPase) (BROOKE e KAISER, 1970). O tipo de fibra pode ser identificado pelas isoformas da cadeia pesada de miosina (MHC) (BRAMELD, 2004). As fibras primárias contêm MHC lento (fibras tipo I, oxidativas) e as fibras secundárias MHC rápido (fibras tipo II, glicolíticas) [Figura 6].

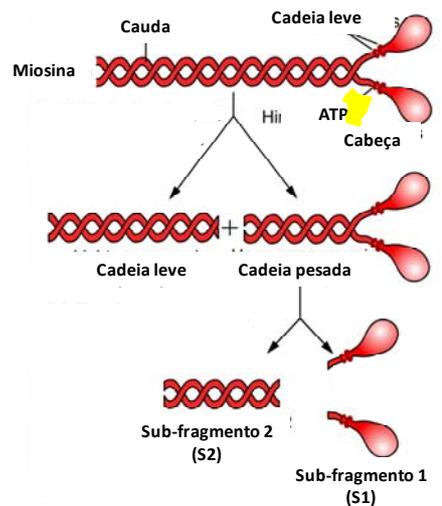


Figura 6: Representação da miosina. Na cabeça da miosina encontra-se o sítio de ligação para o ATP. O pescoço regula a atividade da cabeça e se liga à calmodulina. A cauda contém sítios de ligação para outras caudas para formar um filamento grosso.

A diferenciação em lenta (tipo I) ou rápida (tipo II) inicia na gestação e diferenciações em subtipos (IIa, IIb e IIc) ocorrem ao longo do desenvolvimento (MALTIN *et al.*, 2001). É provável que a idade em que ocorre a diferenciação dos tipos de fibras dependa do músculo estudado. Por exemplo, a diferenciação de fibras do músculo sóleo de ratos ocorre após o nascimento, enquanto que a diferenciação de fibras dos músculos gastrocnêmio e lumbricais ocorre no período de gestação (ISHIHARA e TAGUCHI, 1991). A espécie a ser estudada também pode interferir na diferenciação de fibras. Em humanos e primatas, a diferenciação histoquímica dos músculos das pernas ocorre antes do nascimento (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Em roedores, as fibras dos músculos das patas são histoquimicamente indiferenciadas nos primeiros dias de vida pós-natal (COSSU *et al.*, 1996). Outra limitação no estudo da diferenciação de fibras musculares respeita ao método empregado. O método para avaliar a habilidade metabólica oxidativo-glicolítica dos tipos de fibras musculares (Nicotinamida adenina dimucleotídeo tetrazólico redutase, NADH-TR) pode não detectar diferenças na habilidade contrátil das fibras (TAJBAKSHI *et al.*, 1998). Neste contexto, os diferentes tipos de fibras podem ser identificados através da ATPase miofibrilar

em pH 9,4, após incubação em meio alcalino (pH 10,4) e nos meios ácidos (pH 4,2; 4,4 e 4,6) para avaliar a habilidade contrátil rápida e lenta dos tipos de fibras musculares (PESTRONK *et al.*, 1992) [Figura 7].



Figura 7. Fotomicrografia de corte transversal do músculo sóleo de ratos. Neste corte observa-se a presença dos três tipos de fibras [Tipo 1 (1), Tipo IIa (2) e Tipo IIb (3)] a partir da reação enzimática da ATPase em pH 4,3 e 9,4.

O estado nutricional durante o período crítico do desenvolvimento do músculo esquelético pode influenciar as características e propriedades contráteis das fibras. Estudos que evidenciem o impacto da desnutrição no número de fibras e as repercussões na vida adulta têm sido realizados. A desnutrição pode atuar como fator indutor de programação fetal sobre a tipagem de fibras e eventualmente sobre a funcionalidade do músculo.

2.2.2 Desnutrição perinatal e impactos na diferenciação de fibras durante o desenvolvimento

A desnutrição no período crítico do desenvolvimento está associada ao aparecimento de resistência à insulina e da diabetes tipo 2 (BARKER, 2007). Estudos epidemiológicos demonstram que os efeitos da programação fetal na composição corporal

estão associados ao aumento do percentual de gordura corporal e a redução na massa muscular na vida adulta (KENSARA *et al.*, 2005). Tem sido especulado que alterações no crescimento e desenvolvimento de fibras musculares podem ser um dos mecanismos subjacentes à programação fetal de doenças metabólicas (FAHEY *et al.*, 2005a). Neste sentido, a morfologia do músculo esquelético pode atuar na patogênese da resistência à insulina uma vez que indivíduos obesos e diabéticos apresentam maior quantidade de fibras glicolíticas e menor percentual de fibras oxidativas (TANNER *et al.*, 2002).

Em ratos, a desnutrição durante a gestação aumentou a proporção de fibras do tipo I e reduziu a proporção de fibras do tipo II no músculo sóleo de filhotes jovens (MALLINSON *et al.*, 2007). Isto foi relacionado à redução no número de fibras secundárias (glicolíticas) formadas no período de gestação. Wilson *et al.* (1988) demonstraram uma redução no número de fibras secundárias do músculo sóleo e lumbricais de ratos recém-nascidos cujas mães foram submetidas à restrição da dieta (30% do consumo da dieta dos controles) na gestação. Durante a lactação, quando a mãe foi re-alimentada *ad libitum*, não houve diferença no número de fibras no sóleo, mas o número de fibras dos músculos lumbricais foi aumentado (WILSON *et al.*, 1988). Estes resultados apontam para a existência de um período crítico de desenvolvimento de fibras secundárias que é o período pré-natal.

A desnutrição materna durante a gestação parece reduzir a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares do feto em desenvolvimento (BRAMELD, 2004). Isto tem repercussões no número e tipo de fibras no período pós-natal. Contudo, os estudos utilizando diferentes modelos de desnutrição (por restrição calórica ou por dieta baixa em proteína) ainda são controversos. Em ratos, a dieta materna baixa em proteína durante o final da gestação (14 aos 22 dias) reduz o número e a densidade de fibras rápidas no músculo sóleo (MALLINSON *et al.*, 2007). Wilson *et al.* (1988) demonstraram que uma dieta restrita

(30% do consumo do controle) durante a gestação com posterior equilíbrio durante a lactação, alterou a proporção de fibras nos músculos lumbricais, mas não no sóleo. Por outro lado, estudos com restrição calórica (40 a 50% da dieta fornecida ao controle) durante a gestação não encontraram alteração no número de fibras dos músculos semitendinoso e gastrocnêmio de animais adultos (BAYOL *et al.*, 2004). O desenvolvimento do músculo ocorre em tempo diferente com o número de fibras em determinado músculo (por exemplo, o sóleo) sendo fixada depois do nascimento. Outros músculos, como por exemplo, o semitendinoso e o gastrocnêmio, parecem ter seu período crítico de distribuição das fibras no período de lactação (BRAMELD, 2004).

Assim, o tipo de desnutrição (percentual de restrição), o período em que ocorre (gestação e/ou lactação), a restrição de um componente específico (por exemplo, quantidade de proteína) e a idade do filhote em que as avaliações são realizadas parece ser determinante no efeito programador da nutrição sobre a tipagem de fibras musculares. Um modelo sugerido para atuar no período crítico do desenvolvimento dos músculos seria a restrição protéica ou calórica durante ambos, gestação e lactação. Neste sentido, poucos estudos têm examinado o efeito da desnutrição materna durante a gestação e lactação e as repercussões na vida adulta dos filhotes.

No período gestacional ocorre uma hiperplasia das fibras musculares e o número de células é fixado no nascimento (BRAMELD, 2004). A hipertrofia das fibras musculares ocorre no período pós-natal e é sensível às alterações ambientais (BRAMELD, 2004). O grau de plasticidade também ocorre após o nascimento, e as fibras lentas podem se tornar rápidas e as fibras rápidas podem se tornar lentas nos músculos lentos (GOUBEL, 1997). O mecanismo subjacente às alterações no fenótipo das fibras ainda está pouco entendido, entretanto, estudos correlacionando estímulos como a inervação do músculo a ação hormonal, fatores mecânicos

(treinamento físico ou hipoatividade), e mudanças no tipo de fibras tem sido publicados (ALMEIDA-SILVEIRA *et al.*, 1996; CORNU *et al.*, 1997; ALLAF *et al.*, 2002; LAMBERTZ *et al.*, 2003).

O exercício físico, a depender do tipo, duração, intensidade e frequência do esforço, pode alterar os tipos de fibras em um determinado músculo submetido ao estímulo. Em resposta a uma carga de exercício físico regular (2h/dia, 5 dias por semana, 30m/min, durante 5 semanas) houve um aumento da expressão da cadeia pesada de miosina no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos que sofreram degeneração por toxina (BIGARD *et al.*, 1999). Em humanos, um treinamento progressivo de resistência de força durante 8 semanas aumentou o percentual de fibras do tipo IIa (transformação de fibras IIb para IIa) no músculo vasto lateral (JENSEN *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que o fenótipo do músculo é sensível às alterações ambientais, particularmente o nível de aptidão física durante o desenvolvimento.

2.3 Treinamento físico e alterações no fenótipo de fibras musculares

As adaptações fisiológicas associadas ao treinamento físico dependem da intensidade, duração e frequência do esforço (LEANDRO *et al.*, 2007). O exercício físico pode ser classificado de acordo com a intensidade como: leve, moderado e intenso. Essa classificação toma como base a realização de alguns testes de esforço máximo para avaliar a concentração de lactato no sangue, o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), e/ou a frequência cardíaca máxima (FC_{max}). Em exercícios de intensidade leve e moderada, a concentração de lactato no sangue permanece estável (variando entre 2 e 4 mmol/L) (LEANDRO *et al.*, 2007). O VO_{2max} e a FC_{max} são os parâmetros fisiológicos mais comumente utilizados em estudos para referenciar a

intensidade do esforço. Assim, um exercício leve geralmente refere de 20 a 50% do VO_{2max} e da FC_{max} , um exercício moderado de 50 a 70% do VO_{2max} e da FC_{max} e o exercício intenso acima de 80% do VO_{2max} e da FC_{max} (LEANDRO, LEVADA *et al.*, 2007). Se o exercício físico é realizado regularmente é denominado de treinamento físico. Assim como o exercício físico, o treinamento físico pode ser classificado como leve, moderado e intenso (LEANDRO *et al.*, 2007).

A proporção dos diferentes tipos de fibras em um músculo pode apresentar plasticidade em resposta a estímulos como o treinamento físico (MALTIN *et al.*, 2001). De fato, as adaptações do músculo ao estresse do exercício físico dependem do tipo de protocolo de treinamento utilizado que leva a adaptações na isoforma da cadeia pesada de miosina e no metabolismo do músculo (CAMPOS *et al.*, 2002). Em humanos, houve um aumento de 32% no percentual de fibras do tipo I e 49% do tipo IIa do músculo *vastus lateralis* em resposta a um treinamento de resistência com intensidade progressiva durante 12 semanas (VISSING *et al.*, 2008). O treinamento de resistência de força (60% de uma repetição máxima) resultou em uma mudança na proporção de fibras do tipo I e tipo IIb para o tipo IIa no músculo *vastus lateralis* de mulheres idosas. Comparados ao controle sedentário, homens treinados (corredores de velocidade) apresentaram um aumento no percentual de fibras do tipo IIc (que co-expressam MHC tipo I e IIa) no músculo *bíceps femoral* (DAHMANE *et al.*, 2006). Em esquiadores treinados, a proporção de fibras do tipo I do músculo tríceps braquial diminuiu de 68,7% para 60,9%, enquanto que a isoforma IIa aumentou de 21,6% para 35,7% (TERZIS *et al.*, 2006).

Em animais o treinamento de resistência em esteira (5 dias/semana, 2 horas/dia, 30 m/min, durante 5 semanas) promoveu uma mudança nas fibras do tipo IIb para IIa, e houve um aumento na proporção de fibras do tipo I no músculo EDL de ratos (BIGARD *et al.*, 1999). Em ratos, a atividade física voluntária durante 35 semanas induziu um aumento no percentual de

fibras do tipo IIb no músculo plantar (KARIYA *et al.*, 2004). Tomados juntos, estes resultados demonstram que o treinamento físico induz uma transição nos fenótipos das fibras musculares em direção ao tipo IIa (glicolítica/oxidativa). As fibras do tipo IIb são mais sensíveis ao treinamento físico e este fato pode ter associação com o recrutamento de fibras durante um determinado esforço e a heterogeneidade ontogênica das miofibrilas (BIGARD *et al.*, 1999). Estas alterações independem do tipo de músculo, mas são diretamente relacionadas ao tipo de treinamento.

A expressão de isoformas da cadeia pesada de miosina durante o desenvolvimento é regulado por fatores miogênicos componentes de células satélites e é sensível a fatores exógenos, incluindo padrões de atividade neural e hormônios (BAYOL *et al.*, 2004). As alterações nas proporções de fibras induzidas pelo treinamento ainda não estão esclarecidas, mas provavelmente estão relacionadas com um aumento na atividade neuromuscular, alongamento do músculo e a fatores metabólicos (ROCKL *et al.*, 2007).

Uma vez que as fibras musculares, quando sujeitas a um estímulo de natureza crônica, parecem sensíveis a um conjunto de adaptações, o papel do treinamento físico moderado e regular sobre a proporção de fibras musculares de animais desnutridos parece ser de interesse. A utilização de um modelo de desnutrição baixa em proteína no período que envolve a proliferação e hipertrofia de células musculares (gestação e lactação, respectivamente) pode esclarecer ou suscitar novos questionamentos a respeito do impacto que o treinamento físico pode exercer em animais programados pela desnutrição e no estudo da origem fetal de doenças metabólicas da vida adulta.

Tendo em consideração o anteriormente exposto, este estudo teve como objetivo verificar o efeito do treinamento físico moderado na morfologia de fibras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de animais submetidos à dieta baixa em proteína durante a

gestação e lactação. Para tanto, em ratos treinados e controles, submetidos ou não à dieta baixa em proteína, foram analisados os seguintes parâmetros: (1) taxa de crescimento dos filhotes; (2) ganho de peso corporal durante o protocolo de treinamento físico; e a (3) proporção de fibras musculares nos músculos sóleo e EDL. Nossa hipótese é que a desnutrição diminui a proporção de fibras oxidativas (tipo I) e aumenta a proporção de fibras glicolíticas (tipo IIa e IIb). O treinamento físico moderado, por sua vez, atenua os impactos da desnutrição mantendo a proporção de fibras oxidativas afetando a proporção de fibras glicolíticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do treinamento físico moderado nos tipos de fibras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de animais submetidos à desnutrição durante a gestação e lactação.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos treinados e controles, submetidos ou não à dieta baixa em proteína:

- (1) taxa de crescimento;
- (2) ganho de peso corporal durante o protocolo de treinamento físico;
- (3) proporção de fibras musculares (tipo I, IIa e IIb) nos músculos sóleo e EDL.

4. HIPÓTESES

São defendidas as seguintes hipóteses de trabalho:

- A desnutrição diminui a proporção de fibras oxidativas (tipo I) e aumenta a proporção de fibras glicolíticas (tipo IIa e IIb).
- O treinamento físico moderado atenua os impactos da desnutrição na proporção de fibras oxidativas, afetando a proporção de fibras glicolíticas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas e receberam dieta balanceada (52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos - Nuvilab CR1-Nuvital®, Curitiba, Paraná, Brasil) (REEVES *et al.*, 1993) e água *ad libitum*. Manteve-se um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas (escuro – 6h às 18h; claro – 18h às 6h) e temperatura ambiente em torno de 22°C.

5.2 Obtenção dos grupos experimentais

Aos 110 dias de idade (peso corporal = $258,8 \pm 5,7$), ratas virgens (n=10) foram acasaladas (2 fêmeas para 1 macho). O dia de visualização da presença de espermatozóides em lâminas montadas contendo secreção vaginal (esfregaço vaginal) foi considerado como o dia de concepção (início da gestação). As ratas gestantes foram transferidas para gaiolas individuais e divididas em dois grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida: grupo controle (C, 17% de caseína, n=5) e grupo desnutrido que recebeu dieta baixa em proteína (D, 8% de caseína, n=5) [Tabela 1].

Tabela 1: Composição das dietas (controle, 17% e baixa em proteína, 8%)

Ingredientes	Quantidade para 1Kg de dieta	
	Baixa em proteína	Controle
Caseína	79,3 g	179,3 g
Vitamina Mix*	10 g	10 g
Mistura Mineral #	35 g	35 g
Celulose	50 g	50 g
Bitartarato de colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de soja	70 ml	70 ml
Amido de milho	750,2 g	650,2 g

Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₂, 120; FeSO₄·7H₂O, 200; elementos traços, 400 (MnSO₄·H₂O, 98; CuSO₄·5H₂O, 20; ZnSO₄·7H₂O, 80; CoSO₄·7H₂O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40 g [per kg of diet]).

* Conteúdo da mistura de Vitaminas (mg/kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0.125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0.1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; p-ácido aminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

Após o nascimento, os grupos permaneceram alimentados com suas respectivas dietas e as ninhadas foram normalizadas para 6 filhotes por mãe. No desmame (22 dias de idade), somente os filhotes machos (2 – 3 filhotes por ninhada) permaneceram no estudo e receberam dieta padrão de biotério (52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos - Nuvilab CR1-Nuvital®) (REEVES *et al.*, 1993) *ad libitum*. Aos 60 dias de idade, metade do número de filhotes provindos de mães controle ou desnutridas foi submetido à um protocolo de treinamento físico moderado durante 8 semanas (LEANDRO, LEVADA *et al.*, 2007), formando 4 grupos: controle (C_f, n=6), submetido à dieta baixa em proteína (D_f, n=6), controle treinado (CT_f, n=6) e submetido à dieta baixa em proteína e treinado (DT_f, n=6) [Figura 8]. Após o período de treinamento, os animais (idade = 125 dias) foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação, e os músculos foram cuidadosamente retirados para análise histológica.

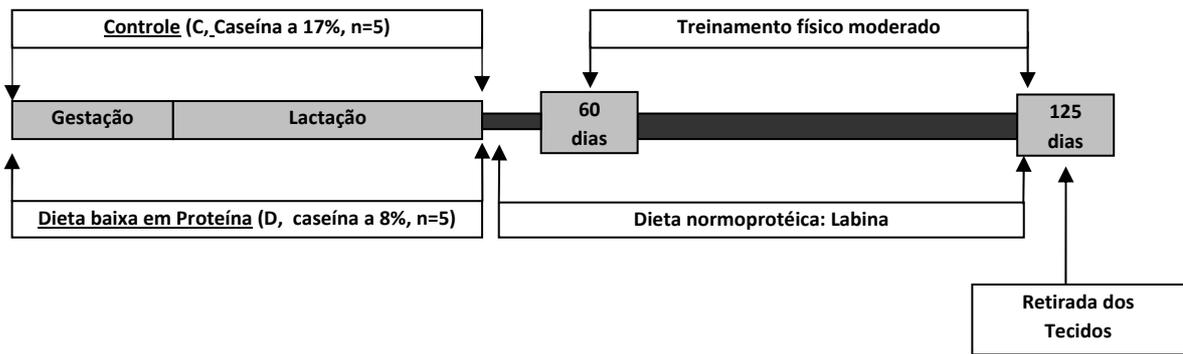


Figura 8: Desenho experimental da manipulação nutricional das mães durante a gestação e lactação. Aos 60 dias de idade, os filhotes machos iniciaram um programa de treinamento físico moderado. Aos 125 dias de idade, os animais foram sacrificados e os tecidos removidos.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 008676/2007-48) e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.3 Protocolo de treinamento físico moderado

Os animais do grupo treinado (CT_f e DT_f) foram submetidos a um programa de treinamento físico moderado, em esteira (EP-131/Insight Equipamentos, São Paulo, Brasil). O programa de treino consistiu em 8 semanas, 5 dias/semana, 60 min/dia a 70% do VO_{2max} [Tabela 2] segundo o protocolo sugerido por Leandro *et al* (2007).

Tabela 2: Descrição do protocolo de treinamento físico moderado de acordo com a velocidade, inclinação e duração de cada sessão durante oito semanas de treinamento.

Semanas	Velocidade (km/h)	Inclinação (°)	Duração (min)
1ª Semana (Adaptação)	0,3	0	5
	0,4	0	5
	0,5	0	5
2ª Semana	0,3	0	5
	0,4	0	5
	0,5	0	20
	0,6	0	30
3ª Semana	0,4	0	5
	0,5	0	5
	0,6	0	10
	0,8	0	10
	0,9	0	30
4ª Semana	0,5	0	5
	0,5	0	5
	0,8	0	10
	0,9	0	10
5ª Semana	1,1	0	30
	0,5	0	5
	0,5	5	5
	0,8	5	10
	0,9	5	10
6ª Semana	1,1	5	30
	0,5	0	5
	0,5	10	5
	0,8	10	10
7ª Semana	0,9	10	10
	1,1	10	30
	0,5	0	5
	0,5	10	5
8ª Semana	0,8	10	10
	0,9	10	10
	1,1	10	30
	0,5	0	5
	0,5	10	5

5.4 Avaliação do peso corporal e da taxa de crescimento

O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente durante todo o período do experimento através de uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,01g. O percentual de ganho de peso corporal foi calculado tendo como base o peso do 1º dia de avaliação, segundo a fórmula:

$$\underline{\% \text{ ganho de peso} = [\text{Peso do dia (g)} \times 100 / \text{Peso do 1}^\circ \text{ dia (g)}] - 100}$$

A taxa de crescimento dos animais foi referente ao valor do ganho de peso corporal diário (em gramas), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\underline{\text{Taxa de crescimento} = \text{Peso do dia} - \text{peso do dia anterior.}}$$

5.5 Análise histológica dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL)

Os animais foram anestesiados (uretana 12,5% e cloralose 0,5% (1 mL/100 g de peso corporal do animal, *via i.p.*) 48 horas após a última sessão de exercício físico. A partir de uma incisão na face lateral da pata posterior, os músculos sóleo e o extensor longo dos dedos (EDL) foram dissecados e imersos em N-Hexano (C₆H₁₄). Esse método de congelamento evita a formação de cristais de água no fragmento do músculo, além de fixar sem desnaturar as enzimas a serem caracterizadas. Nessas condições os músculos congelados foram estocados e conservados em tubos armazenados em freezer a -80° C para posterior processamento (TOSCANO *et al.*, 2008).

Para obtenção de coloração característica da atividade ATPásica da miosina foi utilizado o método proposto por Brooke e Kaiser (1970). Os músculos foram mantidos em suporte com a utilização do *TissueTek*[®] *O.C.T Compound* (Sakura Finetek USA, Inc.,

Torrance, CA 9050 U.S.A.), que é utilizado após a fixação do tecido e antes da criosecção e foram mantidos a -15 ± 2 °C. Para as secções transversais dos músculos (10 μ m) foi utilizado um criostato (LEICA modelo CM1100, Nussloch - Alemanha). Os cortes foram fixados em lâminas e ao atingirem a temperatura ambiente foi iniciada a coloração (PESTRONK *et al.*, 1992).

Os cortes transversais dos músculos foram pré-incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em 400 mL de solução contendo 280 mL de ácido acético a 0,2M (12,7 mL de ácido acético e 1000 mL de água destilada) e 120 mL de acetato de sódio a 0,2M (27,2g acetato de sódio) cujo pH era ajustado para 4,3 ou 4,55. Em seguida, as lâminas eram lavadas em água destilada e incubadas a 37°C em uma solução, contendo ATP (pH 9,4) durante 40 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada e mergulhadas em solução de cloreto de cobalto a 2% durante 5 minutos, para revelação em solução de sulfeto de amônio a 5%. Após a revelação os fragmentos de músculos foram desidratados em uma bateria crescente de alcoóis (70° a 100°), por fim foram imersas duas vezes em tolueno. Após a secagem as lâminas foram montadas utilizando New Entellan[®] Merck (BROOKE E KAISER, 1970).

Os diferentes tipos de fibras musculares presentes nos cortes histológicos foram analisados (Figura 9A e 9B). As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação da ATPase após a pré-incubação em meio ácido (pH 4,3 e 4,55), nos três tipos principais: I (fibras lentas oxidativas, escuras), IIa (fibras rápidas oxidativas-glicolíticas, clara) e IIb (fibras rápidas glicolíticas, coloração intermediária) (BROOKE E KAISER, 1970). Todas as fibras foram contadas em cada corte histológico e os valores referentes aos diferentes tipos de fibras foram expressos em percentual do número total. Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 4 X)

acoplado a um programa para captação de imagens (TV TUNER APPLICATION – TelSignal Company Limited, Taiwan). Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Madre-Amiens, França) (Figuras 10A e 10B).

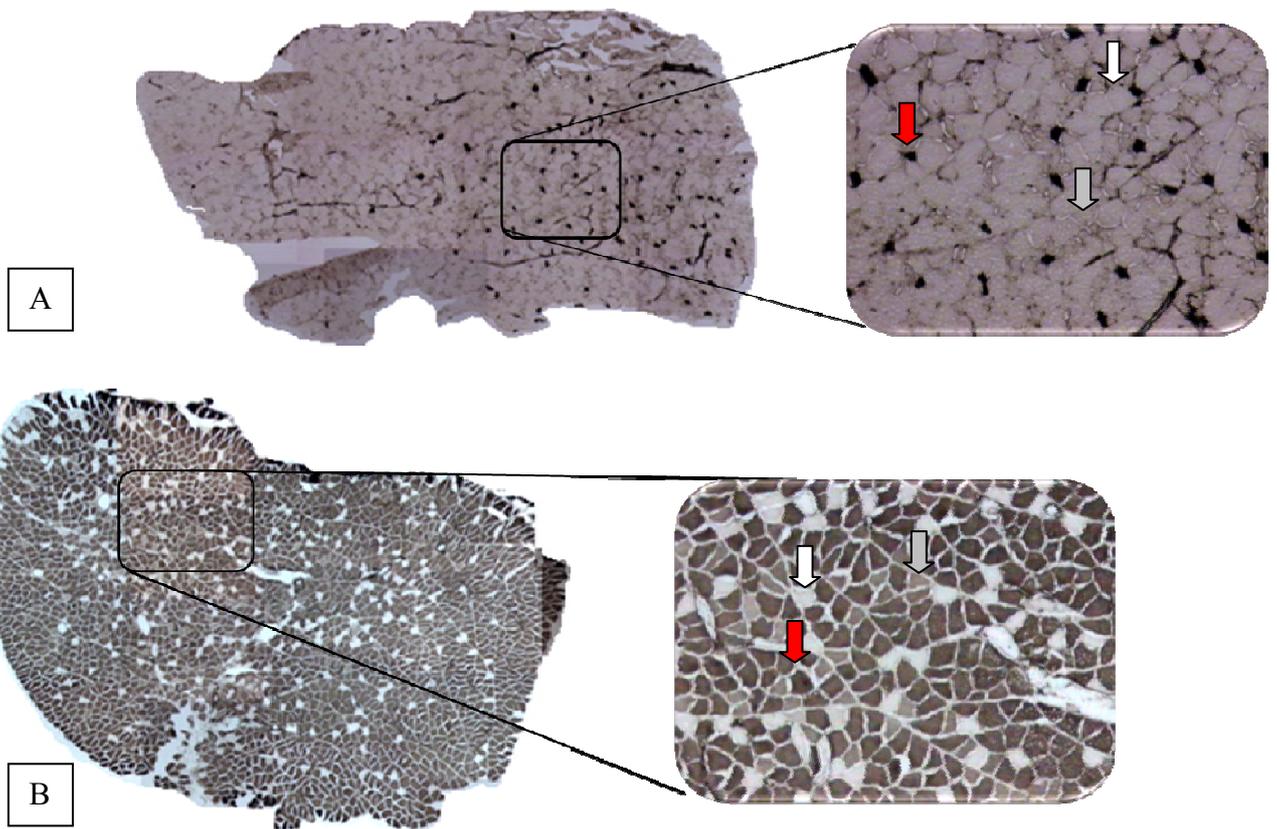


Figura 9: Ilustração de um corte transversal do músculo EDL (A) e do músculo Sóleo (B) em pH 4,55. Em destaque quadros em aumento 4 x utilizados para análise de tipos de fibras. Setas vermelhas (fibras do tipo I), setas cinzas (fibras do tipo IIa) e setas brancas (fibras do tipo IIb)

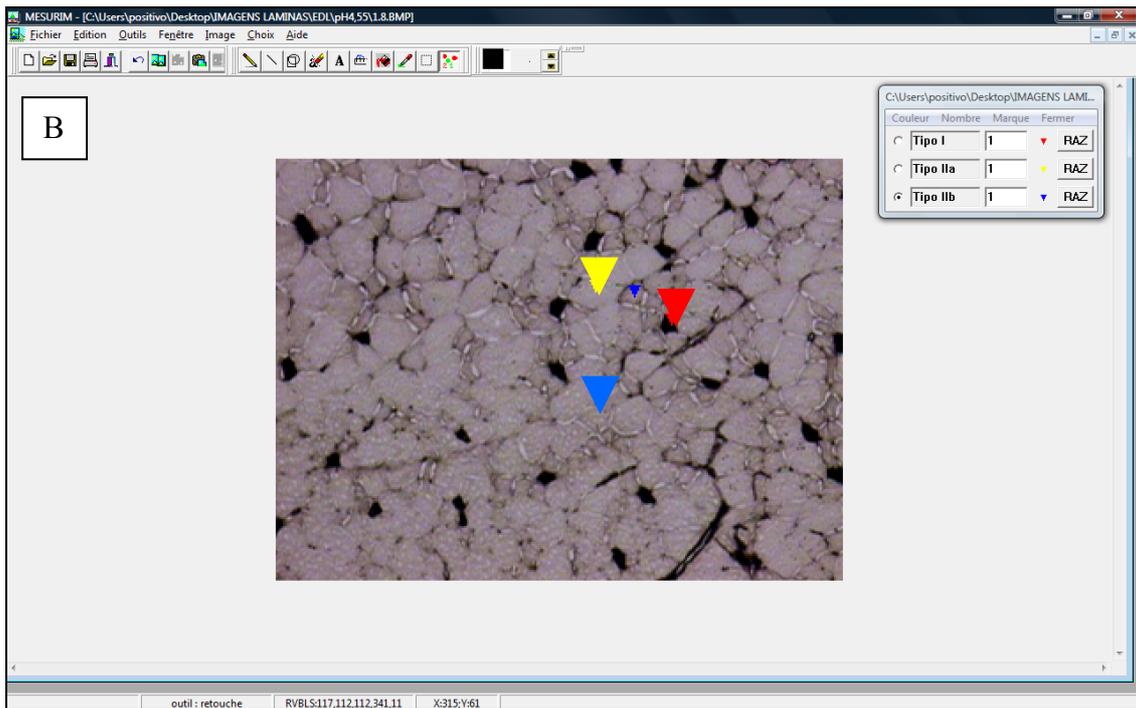
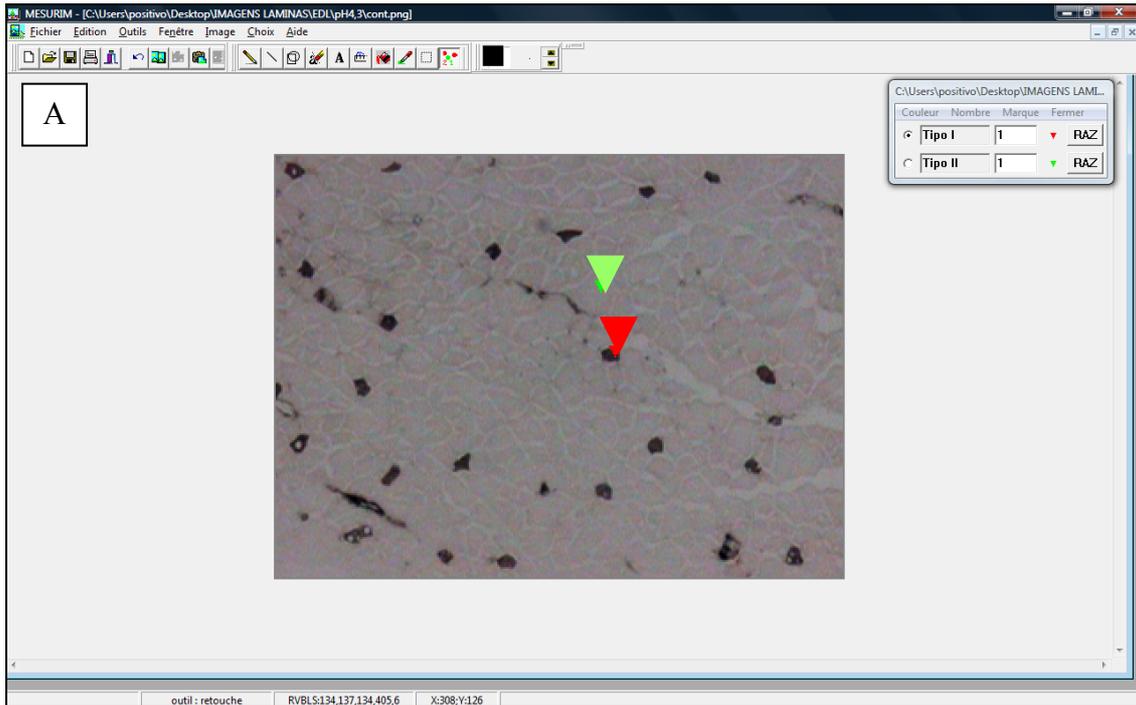


Figura 10A: Ilustração da análise dos tipos de fibras através do software Mensurim Pro 3.2. Músculo EDL em pH 4,3(A) e em pH 4,55(B). Triângulo vermelho indica célula Tipo I, triângulo verde célula Tipo II, triângulo amarelo células Tipo IIa e triângulo azul célula Tipo IIb.

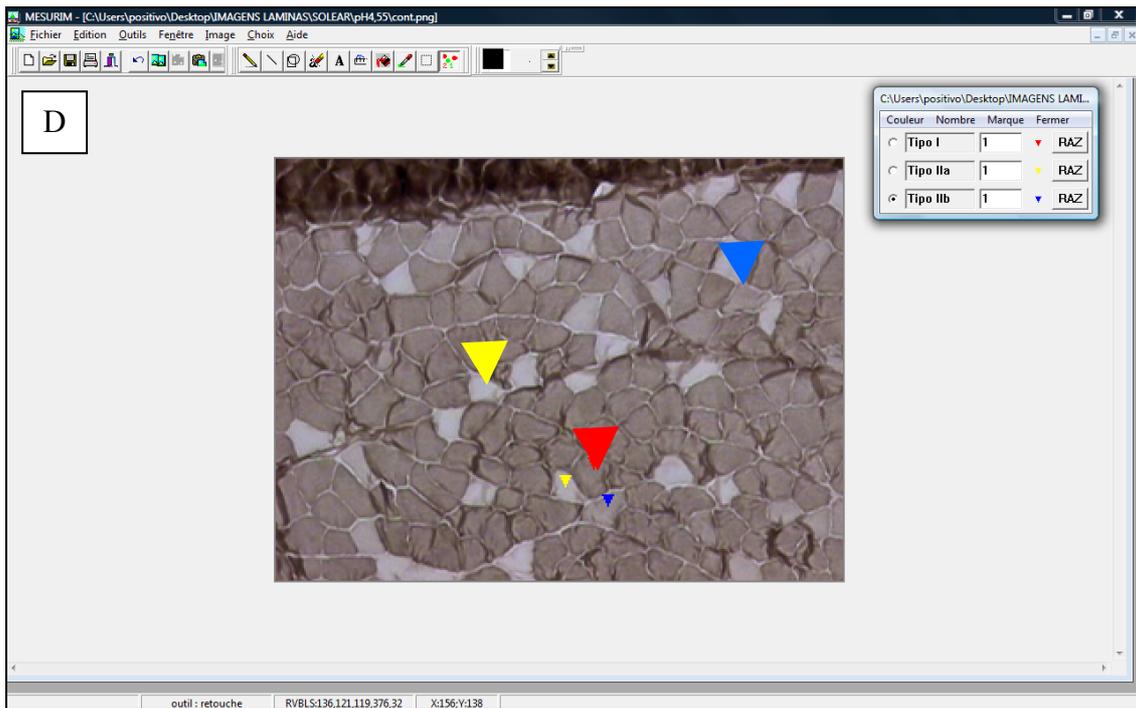
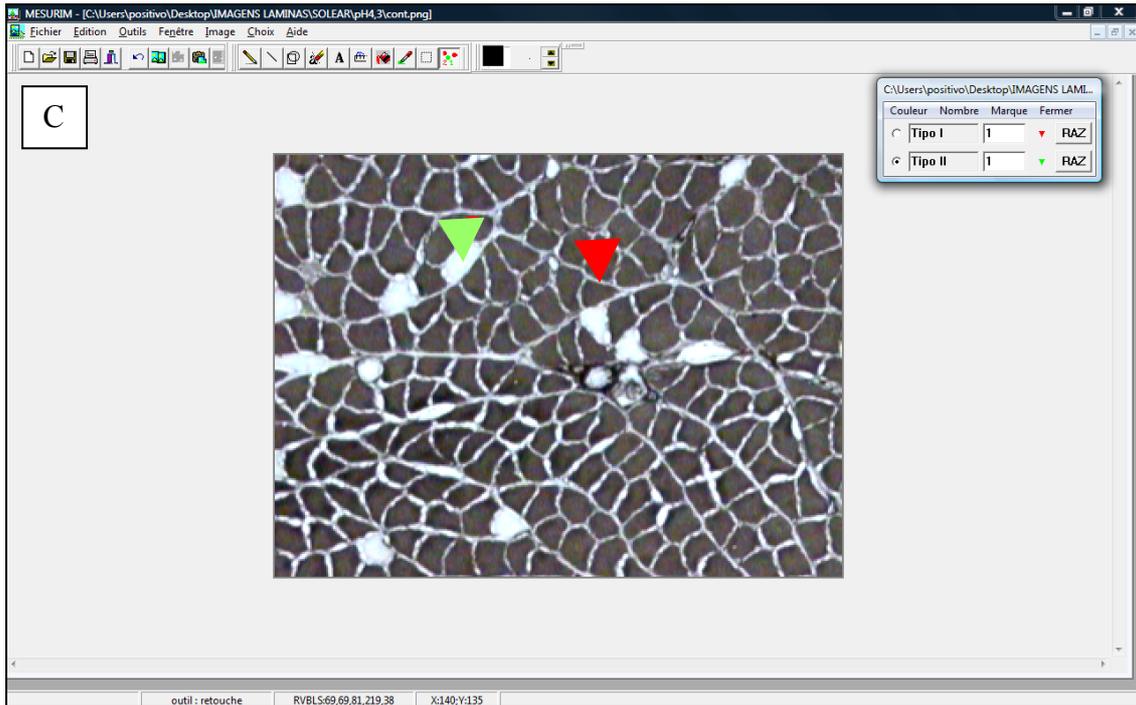


Figura 10B: Ilustração da análise dos tipos de fibras através do software Mensurim Pro 3.2. Músculo Sóleo em pH 4,3 (C) e em pH 4,55 (D). Triângulo vermelho indica célula Tipo I, triângulo verde célula Tipo II, triângulo amarelo células Tipo IIa e triângulo azul célula Tipo IIb.

5.6 Análise estatística

Os valores são expressos em média e erro padrão da média. Para comparação entre os grupos durante a gestação e lactação foi utilizado o *t-test student* de medidas independentes. Para comparação entre grupos durante o período de crescimento, foi utilizado o teste de variância ANOVA Two-way seguido do 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.

6. RESULTADOS

A apresentação dos resultados está dividida em duas partes: a primeira descreve o efeito da desnutrição durante a gestação e lactação no ganho de peso corporal das fêmeas e as repercussões nos filhotes até os 60 dias de vida; a segunda parte descreve o efeito do treinamento físico moderado sobre o ganho de peso corporal e a morfologia de fibras dos músculos sóleo e EDL dos filhotes.

1ª PARTE

Efeito da desnutrição por dieta baixa em proteína sobre o ganho de peso durante a gestação e lactação e o peso ao nascer dos filhotes.

As ratas que consumiram dieta baixa em proteína (D, caseína a 8%) apresentaram um menor ganho de peso corporal no último terço da gestação ($C = 29,7 \pm 1,1$; $D = 20,8 \pm 0,7$; $p < 0,05$) [Figura 11]. Os dados foram ajustados para o número total de filhotes nascidos por mãe [$C = 12$ (8 – 12); $D = 9$ (7 – 11); valores são expressos em mediana (mínimo e máximo)], e o coeficiente de correlação entre o número de filhotes nascidos e o ganho de peso corporal das mães não foi significativo ($r^2 = 0,41$, $p = 0,112$).

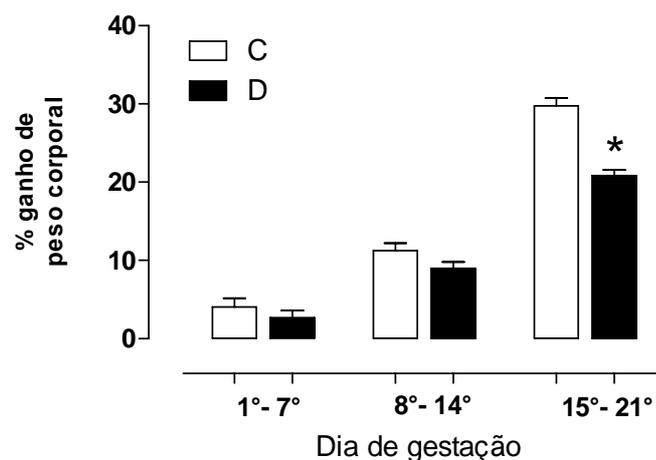


Figura 11: Ganho de peso corporal durante a gestação de ratas controle (C, n=5) e submetidas à dieta baixa em proteína (D, n=5). A análise foi realizada em cada terço da gestação tomando o peso corporal no 1º dia de gestação. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, *T-test student*.

Não houve diferença no peso ao nascer dos filhotes provindos de mães submetidas à dieta baixa em proteína ($C_f = 6,6 \pm 0,03$; $D_f = 6,4 \pm 0,1$; $p = 0,347$). Contudo a taxa de crescimento dos filhotes de mães alimentadas com dieta baixa em proteína foi menor desde a lactação até o 60° dia de vida [Tabela 3].

Tabela 3: Efeito da dieta baixa em proteína sobre a taxa de crescimento (g/dia) dos filhotes durante a lactação, do 22° ao 30° dia de vida e do 31° ao 60° dia de vida. Valores expressos em média \pm E.P.M. *T-test student* para análise estatística.

<i>Taxa de crescimento (g/dia)</i>	Controle (<i>n=12</i>)	Dieta baixa em Proteína (<i>n=12</i>)	P
Lactação	1,76 \pm 0,09	0,76 \pm 0,03	< 0.010
22° – 30° dia	3,96 \pm 0,06	2,42 \pm 0,03	< 0.001
31° - 60° dia	6,06 \pm 0,1	4,96 \pm 0,1	< 0.001

2ª PARTE

Efeito do treinamento físico moderado sobre o ganho de peso corporal e a morfologia de fibras dos músculos sóleo e EDL dos filhotes.

Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos de acordo com a realização ou não do protocolo de treinamento físico moderado. Todos os animais apresentaram um aumento no peso corporal dos 60 aos 125 dias [Figura 12A]. Os animais do grupo D_f e DT_f apresentaram um menor peso corporal quando comparado aos seus respectivos controles (C_f e CT_f) [Figura 12A]. Contudo, ao longo das semanas de treinamento, os animais do grupo D_f e TD_f apresentaram um maior ganho de peso corporal e para o grupo D_f este aumento permaneceu até os 125 dias de idade [Figura 12B]. O ganho de peso corporal dos animais do grupo DT_f foi semelhante aos grupos C_f e CT_f a partir da 4ª semana de treinamento [Figura 12B].

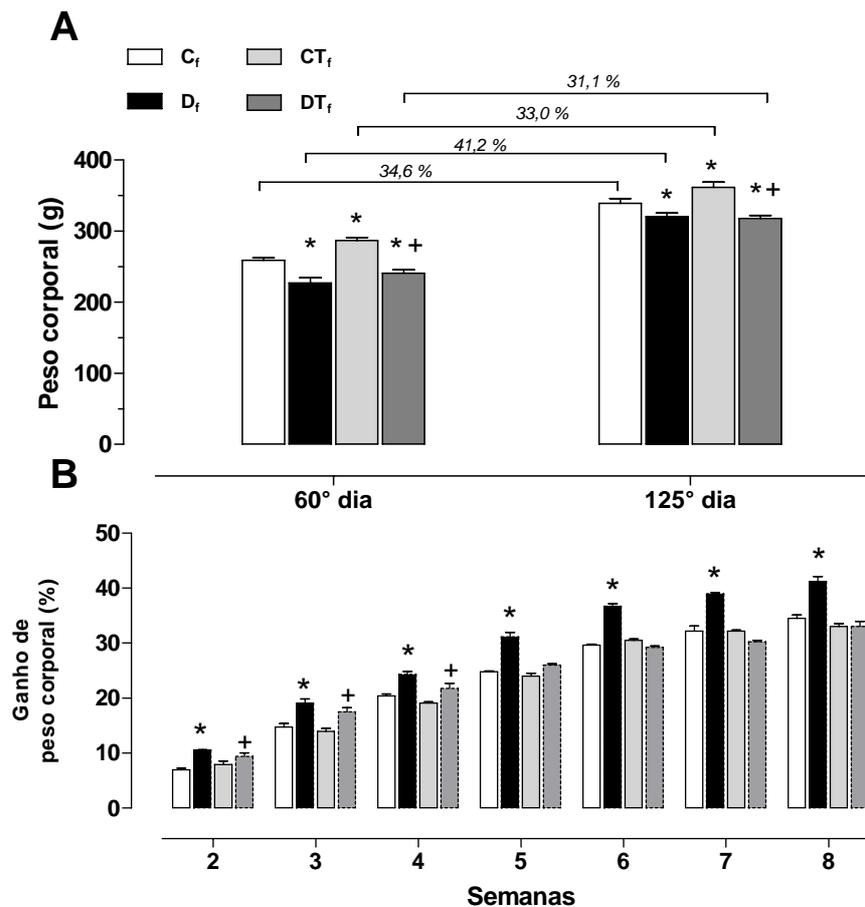


Figura 12: Peso corporal dos animais (A) e percentual do ganho de peso corporal (B) a partir dos 60 dias de idade dos grupos controle (C_f, n=6), submetidos a uma dieta baixa em proteína (D_f, n=6), treinados (CT_f, n=6) e submetidos a uma dieta baixa em proteína e treinandos (DT_f, n=6). Os valores percentuais representam a variação de peso entre o 60º e 125º dia de vida. Os valores são expressos em média ± E.P.M. ANOVA two-way seguido do teste de Bonferroni. *p<0.05 quando comparado ao grupo C_f. + p<0.05 quando comparado ao grupo D_f.

A avaliação dos tipos de fibras dos músculos sóleo e EDL foi realizada pela técnica da ATPase após pré-incubação em diferentes pH. Os tipos de fibras oxidativas (tipo I) e glicolíticas (tipo II) foram identificadas em pH 4,3. Quando comparado aos animais do grupo C_f, os animais do grupo D_f apresentaram um menor percentual de fibras do Tipo I (C_f = 82,5 ± 0,4; D_f = 78,2 ± 0,9, p<0,05) e um maior percentual de fibras do Tipo II (C_f = 17,4 ± 0,4; D_f = 21,7 ± 0,9, p<0,05) no músculo sóleo [Figuras 13A e 13B]. O percentual de fibras do Tipo I e II não alterou nos animais do grupo T_f e DT_f quando comparado aos animais do grupo

C_f , contudo, houve uma diminuição no percentual de fibras do Tipo II nos animais do grupo TD_f quando comparado aos animais do grupo CT_f [Figuras 13A e 13B]. Com relação a contagem relativa dos tipos de fibras do músculo EDL no pH 4,3, não houve diferença entre os grupos [Figuras 13A e 13B].

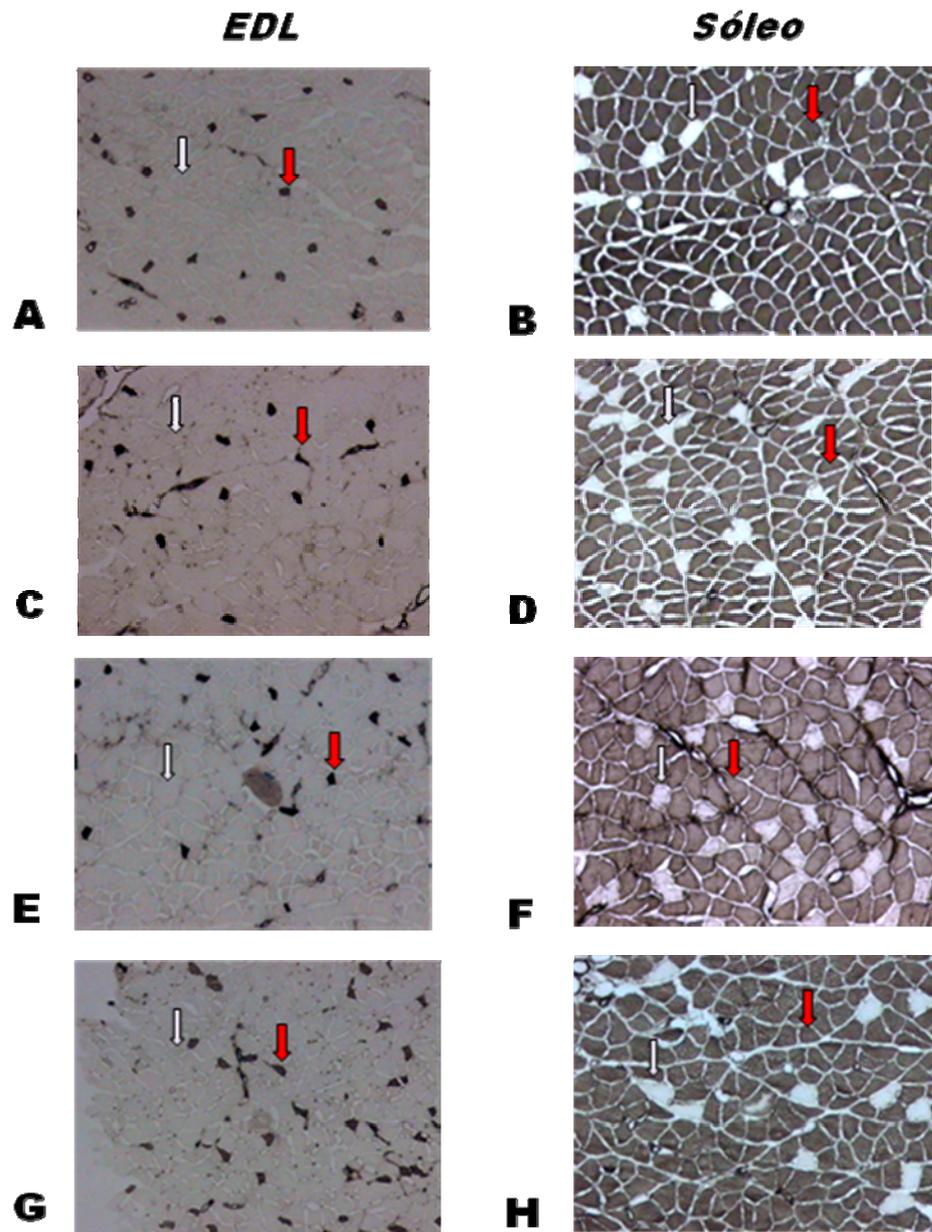


Figura 13A: Cortes transversais dos músculos EDL e sóleo pré-incubados a um pH de 4,3 de cada grupo experimental: controle (A e B), submetido à uma dieta baixa em proteína (C e D), treinados (E e F) e submetidos à uma dieta baixa em proteína e treinados (G e H). Setas vermelhas identificam fibras do Tipo I e setas brancas identificam fibras do Tipo II.

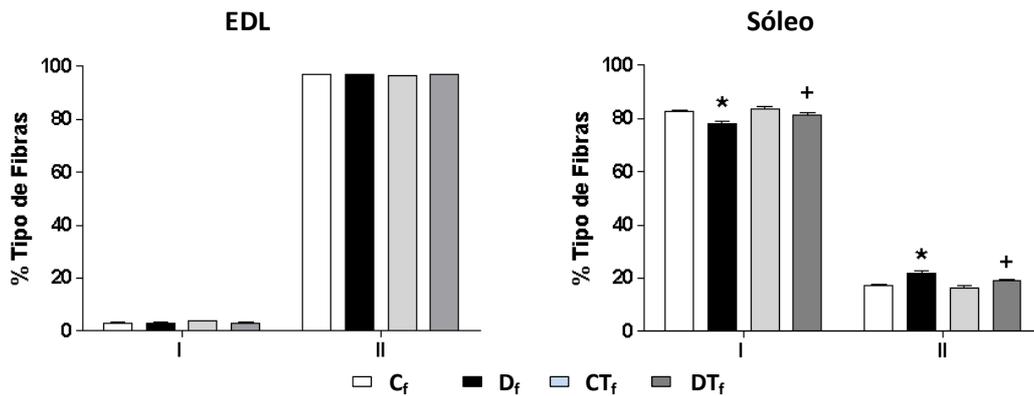


Figura 13B. Os gráficos demonstram a média \pm E.P.M dos valores percentuais a partir da contagem total de fibras nos cortes. Controle (C_f, n=6), submetidos a uma dieta baixa em proteína (D_f, n=6), treinados (CT_f, n=6) e submetidos a uma dieta baixa em proteína de treinados (DT_f, n=6). Teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. * p<0.05 quando comparados ao grupo C_f. + p<0.05 quando comparados ao grupo D_f.

Os tipos de fibras I (oxidativas), IIa (oxidativas e glicolíticas) e IIb (predominantemente glicolíticas) dos músculos sóleo e EDL foram identificadas a partir da atividade enzimática da ATPase em pH 4,55. Na avaliação dos tipos de fibras do músculo EDL, os animais do grupo CT_f apresentaram um aumento do percentual de fibras do Tipo IIa (CT_f = 68,8 \pm 0,7; C_f = 59,5 \pm 1,1; p<0,05) e uma diminuição no percentual de fibras do Tipo IIb (CT_f = 32,2 \pm 0,6; C_f = 36,7 \pm 1,1; p<0,05) quando comparados aos animais do grupo C_f (Figuras 14A e 14B). Os animais do grupo DT_f apresentaram um aumento no percentual de fibras do tipo IIa (DT_f = 62,2 \pm 1,6; D_f = 56,9 \pm 1,4; p<0,05) e uma diminuição no percentual de fibras do tipo IIb (DT_f = 34,6 \pm 1,6; D_f = 40,3 \pm 1,6; p<0,05) quando comparados aos animais do grupo D_f. O percentual de fibras do tipo I no músculo EDL não alterou quando os grupos foram comparados [Figura 14A e 14B].

Com relação ao músculo sóleo, nos animais do grupo D_f houve uma diminuição no percentual de fibras do tipo I (D_f = 77,8 \pm 0,5; C_f = 83,1 \pm 0,5; p<0,05) e um aumento no percentual de fibras do tipo IIa (D_f = 19,0 \pm 0,4; C_f = 12,9 \pm 0,4; p<0,05) quando comparado

aos animais do grupo C_f [Figura 14A e 14B]. Os animais do grupo CT_f apresentaram um aumento no percentual de fibras do tipo IIa ($CT_f = 15,1 \pm 0,2$) e o percentual de fibras do tipo I não alterou ($CT_f = 83,7 \pm 0,2$). Os animais do grupo DT_f apresentaram um aumento no percentual de fibras do tipo I ($80,3 \pm 0,7$) e uma diminuição no percentual de fibras do tipo IIa ($17,2 \pm 0,7$) quando comparados aos animais do grupo D_f . Da mesma forma, os animais do grupo D_f ($2,1 \pm 0,1$) apresentaram um menor percentual de fibras do tipo IIb quando comparados aos animais do grupo C_f ($3,9 \pm 0,2$) [Figura 14A e 14B].

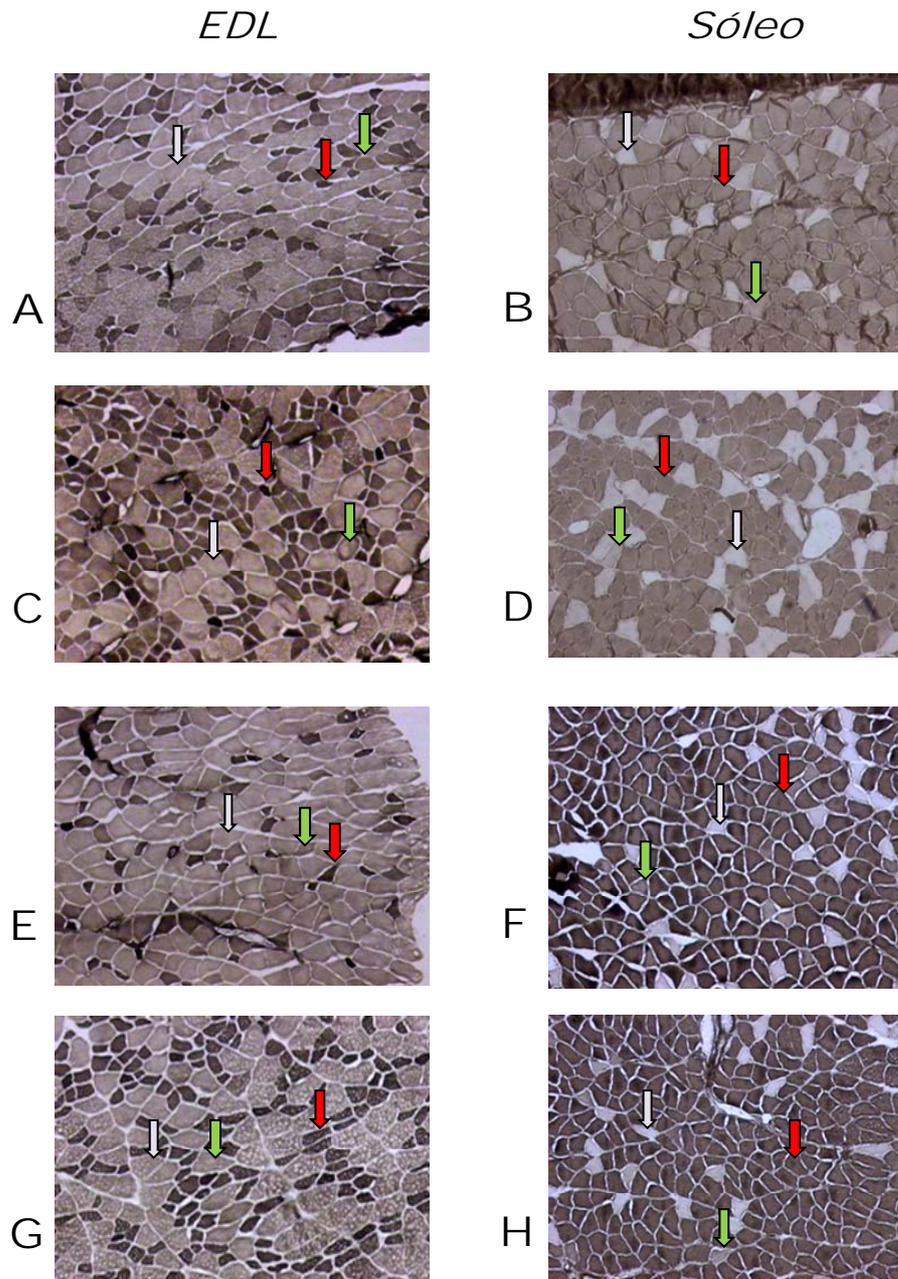


Figura 14A: Cortes transversais dos músculos EDL e sóleo pré-incubados a um pH de 4,55 de cada grupo experimental: controle (A e B), submetido à uma dieta baixa em proteína (C e D), treinados (E e F) e submetidos à uma dieta baixa em proteína e treinados (G e H). Setas vermelhas identificam fibras do tipo I, setas verdes identificam fibras do tipo IIa e setas brancas identificam fibras do tipo IIb.

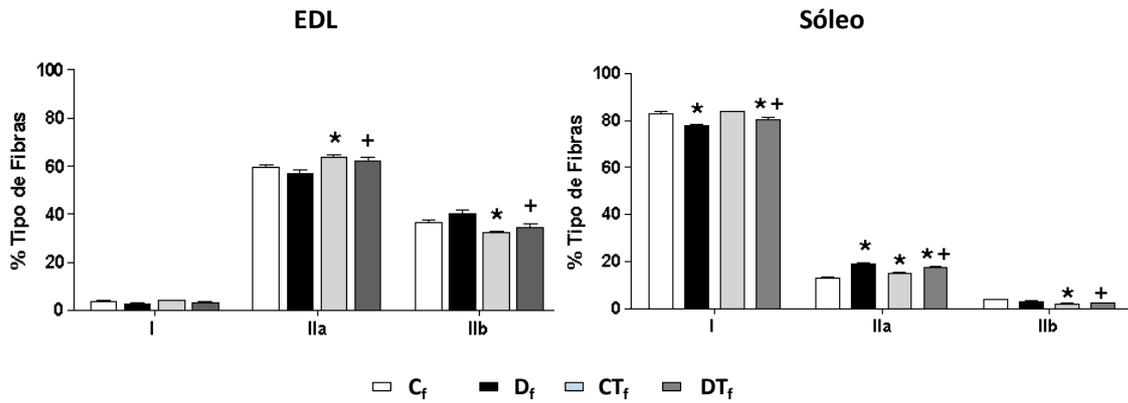


Figura 14B. Os gráficos demonstram a média \pm E.P.M dos valores percentuais a partir da contagem total de fibras nos cortes. Controle (C_f, n=6), submetidos a uma dieta baixa em proteína (D_f, n=6), treinados (CT_f, n=6) e submetidos a uma dieta baixa em proteína de treinados (DT_f, n=6). Teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. * p>0.05 quando comparados ao grupo C_f. + p>0.05 quando comparados ao grupo D_f.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo testar a hipótese que o treinamento físico moderado atenua os efeitos da desnutrição perinatal na proporção de fibras dos músculos sóleo e EDL de ratos adultos. Vários estudos têm verificado que a desnutrição materna durante o período crítico de desenvolvimento do músculo diminui o número de fibras musculares afetando a taxa de crescimento do filhote e favorecendo o aparecimento de doenças metabólicas (WILSON E HUGHES, 1997; MALTIN *et al.*, 2001; KENSARA *et al.*, 2005; SAYER e COOPER, 2005). Por outro lado, também tem sido amplamente reconhecido que a treinamento físico tem efeitos positivos no ganho de força muscular, no metabolismo dos lipídeos e carboidratos, atuando como co-adjuvante no tratamento da obesidade, de doenças cardiovasculares e na diabetes tipo II (HIRABARA *et al.*, 2006; LEANDRO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007; PARENTE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2008). Estes efeitos positivos são relacionados às adaptações que ocorrem no músculo esquelético pela expressão específica de proteínas contráteis (isoforma da cadeia pesada de miosina) e pelo aumento na atividade e no conteúdo mitocondrial (capacidade oxidativa) (ROCKL *et al.*, 2007). Nossos resultados mostram que o treinamento físico moderado também teve efeitos positivos aumentando a proporção de fibras oxidativas no músculo de animais submetidos a uma dieta baixa em proteína.

Um modelo animal de estudo da programação fetal bem estabelecido é fornecer uma dieta normoprotéica (com 18 a 20% de proteína, caseína) ou uma dieta hipoprotéica (7% a 8% de proteína, caseína) às mães durante a gestação e lactação, e, a partir do desmame, os filhotes começam a receber dieta padronizada (CRIPPS *et al.*, 2007; COTTRELL e OZANNE, 2008; MARTIN-GRONERT *et al.*, 2008). No nosso estudo, mães submetidas à dieta hipoprotéica apresentaram um menor ganho de peso corporal no último terço da gestação. Resultados similares com o mesmo modelo de desnutrição foram encontrados em estudos

prévios (FERNANDEZ-TWINN *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2009). No nosso estudo, não houve alteração no peso ao nascer dos filhotes, mas a taxa de crescimento até os 60 dias de idade foi reduzida em cerca de 60% nos animais de mães desnutridas. A redução na taxa de crescimento dos filhotes de mães desnutridas já está bem estabelecida na literatura e parece ter uma associação direta com a diminuição permanente no número de células musculares (WILSON *et al.*, 1988; BAYOL *et al.*, 2004). Wilson *et al.* (1988) verificaram uma redução de 29% no número de fibras do músculo sóleo e de 34% no músculo *lumbricais* de fetos (20º dia) de mães desnutridas (restrição de 30% da dieta). Quando a dieta equilibrada foi fornecida no período de lactação, a redução no número de fibras de ambos os músculos dos filhotes aos 28 dias de vida permaneceu reduzida (WILSON *et al.*, 1988). Mallinson *et al.* (2007) verificaram que a desnutrição protéica (9% de caseína) durante a gestação reduziu o número e a densidade de fibras do tipo I do músculo sóleo de filhotes com 4 semanas de idade. Apesar dos estudos utilizarem diferentes modelos de desnutrição, é provável que a taxa de crescimento de filhotes de mães desnutridas esteja relacionada ao percentual de massa magra do corpo que foi diminuído desde a vida fetal.

Por outro lado, a partir dos 60 dias de idade, os animais que foram desnutridos apresentaram um maior ganho de peso corporal, embora tenham permanecido com peso corporal menor que o controle. Este resultado pode estar associado ao aumento do percentual de gordura corporal nos animais desnutridos, uma vez que a desnutrição fetal também altera o desenvolvimento dos adipócitos resultando em adipogênese e lipogênese na vida adulta (MARTIN *et al.*, 1998; PASSOS *et al.*, 2008). Nos animais treinados e que foram desnutridos, o ganho de peso corporal foi maior apenas nas três primeiras semanas. O treinamento físico leve e moderado aumenta a mobilização de ácidos graxos dos adipócitos e sua utilização no músculo esquelético (HIRABARA *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2008). E este efeito pode

estar relacionado a um menor acúmulo de gordura no tecido adiposo e aumento da massa magra (SILVEIRA *et al.*, 2008). Assim, o treinamento físico moderado parece atenuar o ganho de peso corporal de animais programados a estocar mais tecido adiposo.

O modelo de desnutrição utilizado no presente estudo foi submeter os animais a uma dieta baixa em proteína durante a gestação e lactação de forma a atingir o período crítico de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Estudos prévios demonstram que, em roedores, a embriogênese de fibras primárias e secundárias do músculo sóleo ocorre no período gestacional e vai até o início da vida pós-natal (WILSON *et al.*, 1988; BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999; BRAMELD, 2004).

De fato, nossos resultados demonstram que animais desnutridos na gestação e lactação apresentaram um menor percentual de fibras do tipo I e um aumento na proporção de fibras do tipo IIa no músculo sóleo. Resultados similares tem sido publicados com modelos de desnutrição pré-natal e percentual de fibras dos filhotes logo após o desmame (WILSON *et al.*, 1988; BAYOL *et al.*, 2004).

Por outro lado, outros estudos não encontraram diferenças na proporção de fibras do tipo I, mas um aumento na proporção de fibras do tipo IIa no músculo sóleo de ratos aos 25, 30 e 90 dias de idade que foram desnutridos na gestação (MALLINSON *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2008).

Os diferentes resultados encontrados estão relacionados ao modelo de desnutrição e a idade pós-natal em que os filhotes foram avaliados.

A desnutrição somente na gestação pode alterar o número de fibras (hiperplasia) que é fixado ao nascimento (BRAMELD, 2004). Se a desnutrição continua até o período de desmame, vão ocorrer também alterações no tamanho das fibras (hipertrofia) (BRAMELD, 2004). A hipertrofia do músculo requer aumento da síntese protéica e o recrutamento de

células precursoras mononucleadas que sob ativação, proliferam, diferenciam e fundem com fibras já existentes restaurando o músculo (ROCKL *et al.*, 2007).

No nosso estudo, os animais foram submetidos à desnutrição até o desmame e isso pode ter repercutido em uma menor síntese de proteínas via sinalização hormonal (BAYOL *et al.*, 2004). Uma vez que as fibras musculares respondem às alterações ambientais mudando o seu fenótipo de forma a se adaptarem a uma demanda metabólica, é provável que a desnutrição perinatal tenha provocado uma conversão de fibras do tipo I e IIb para o tipo IIa. É interessante observar que os animais que foram desnutridos permaneceram sedentários em suas respectivas gaiolas até os 125 dias de idade. Portanto, não houve nenhum estímulo ambiental que induzisse alterações nesta proporção de fibras. Diante disso, é de se especular que, se não houver estimulação ambiental, as fibras primárias (oxidativas) e secundárias (glicolíticas) podem ser susceptíveis à programação fetal induzida pela desnutrição (WILSON *et al.*, 1988). Outro mecanismo proposto que associa a desnutrição fetal ao fenótipo de fibras na vida adulta é a resposta reflexa do músculo via inervação dos motoneurônios (FREITAS-SILVA *et al.*, 2008). Animais submetidos a um modelo de hipoatividade por suspensão das patas traseiras apresentam uma diminuição no percentual de fibras lentas (tipo I) e esta alteração é associada à ineficiência da inervação de motoneurônios (ALMEIDA-SILVEIRA *et al.*, 2000).

Os animais treinados apresentaram aumento na proporção de fibras do tipo IIa tanto no músculo sóleo como no EDL. O aumento na proporção de fibras do tipo IIa em resposta a um treinamento físico já está bem estabelecido (BIGARD *et al.*, 1996; BIGARD *et al.*, 1999; CAMPOS *et al.*, 2002; KARIYA *et al.*, 2004; ROCKL *et al.*, 2007). A população de fibras em um determinado músculo é dinâmica e se adapta de acordo com a estimulação ambiental, e o treinamento físico tem sido reconhecido como principal estímulo para mudança

nos tipos de fibra (HOSTLER *et al.*, 2001). É de ressalva que o aumento na proporção de um determinado tipo de fibra é diretamente relacionado com a intensidade e duração do esforço (VISSING *et al.*, 2008). Em resposta a um protocolo de treinamento físico (8 semanas de treinamento progressivo de resistência), houve diminuição na percentagem de fibras do tipo IIb com concomitante aumento do percentual de fibras do tipo IIa do músculo vasto lateral de homens (CAMPOS *et al.*, 2002). Em ratos, um protocolo de treinamento físico durante 10 semanas resultou no aumento do percentual de fibras do tipo I e diminuição no percentual de fibras do tipo II no músculo *plantaris* e vasto lateral (LUGINBUHL *et al.*, 1984). Neste mesmo estudo, não houve alteração no percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo (LUGINBUHL *et al.*, 1984). Em resposta a um protocolo de treinamento físico (18 m/min, 8% inclinação, 20 min/dia, 5 dias/semana) houve um aumento de fibras do tipo IIa no músculo *plantaris* de ratos com 10 semanas de idade. Apesar dos estudos utilizarem diferentes protocolos de treinamento físico e da especificidade de cada músculo, parece que os resultados convergem para alterações fenotípicas na direção das fibras do tipo IIa. As fibras do tipo IIa são caracteristicamente oxidativas e glicolíticas podendo alterar seu fenótipo para fibras do tipo I ou IIb (BIGARD *et al.*, 1999). Estas alterações fenotípicas estão relacionadas ao sistema regulatório do Ca^{+2} , a composição de proteínas e a eficiência do metabolismo (KARIYA *et al.*, 2004). Ademais, a mudança de fibras está positivamente associada ao metabolismo no músculo e tem sido contemplada no tratamento de doenças metabólicas, como por exemplo, a obesidade e a diabetes tipo II (SULLIVAN, 1982; HORTON, 1986; SUN *et al.*, 2008).

O principal resultado do presente estudo respeita as alterações mínimas no percentual de fibras dos músculos sóleo e EDL dos animais submetidos à desnutrição hipoprotéica e posteriormente treinados. Como anteriormente descrito, embora o genoma fetal possa determinar o crescimento e a diferenciação do músculo, o estímulo ambiental pode,

efetivamente, alterar os tipos de fibras de acordo com a demanda metabólica. É bem aceito que a formação de fibras musculares e o crescimento pós-natal são regulados pelo fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) e pelo hormônio do crescimento (GH) via ativação de células satélites e aumento da síntese de proteína no músculo (BAYOL *et al.*, 2004; De Moura *et al.*, 2007). A desnutrição fetal afeta o eixo GH/IGF e algumas das alterações podem levar a distúrbios permanentes na via de sinalização do IGF-1 e do GH em vários tecidos, inclusive o músculo esquelético (SETIA e SRIDHAR, 2009). De Moura *et al.* (2007) verificaram que a desnutrição durante a lactação pode programar a expressão do RNAm do hormônio do crescimento em ratos adultos. Em adição, o nível sistêmico de IGF-1 é também reduzido em filhotes que foram submetidos à desnutrição fetal (TOMITA *et al.*, 2001). Estas alterações estão relacionadas ao aparecimento da resistência à insulina e hipertensão e podem atuar na gênese da obesidade e da diabetes tipo II.

Por outro lado, o treinamento físico parece aumentar a proporção e a eficiência de fibras que utilizam glicose e ácidos graxos para produzir energia (GOODYEAR e KAHN, 1998). No nosso estudo, a proporção de fibras oxidativas dos animais desnutridos e treinados foi maior quando comparada ao seu controle apenas desnutrido. Nossos resultados apontam para o papel protetor do treinamento físico na manutenção de fibras glicolíticas-oxidativas mesmo em animais programados a desenvolver síndrome metabólica. É provável que o mecanismo subjacente esteja relacionado a mudanças intrínsecas no músculo via ação parácrina e autócrina de mediadores hormonais, aumento da expressão de proteínas da via glicolítica e lipolítica, ou ainda pela biogênese mitocondrial (SILVEIRA *et al.*, 2008). É provável também que a ação sistêmica de hormônios possam modular o restabelecimento de fibras musculares mesmo em animais programados (GOODYEAR e KAHN, 1998). Ratos diabéticos apresentaram uma diminuição na concentração de GH e IGF-1 que foi revertida

quando os animais foram submetidos a um programa de treinamento físico (natação, 5 dias/semana, 1h/dia, a 90% do lactato máximo, durante 8 semanas) (GOMES *et al.*, 2009). Em humanos obesos, o treinamento físico (16 semanas de treinamento de resistência) aumentou a secreção de GH e diminuiu o percentual de gordura na região abdominal (IRVING *et al.*, 2009). Tomados juntos, as alterações na proporção de fibras oxidativas observadas em nosso estudo e a modulação de hormônios metabólicos citados na literatura (SETIA e SRIDHAR, 2009) parecem fornecer novos dados para o entendimento do mecanismo celular e molecular da programação fetal associada ao metabolismo no músculo.

8. CONCLUSÃO

A desnutrição hipoprotéica durante a gestação e lactação tem efeito programador na proporção de fibras musculares nos animais adultos. Por outro lado, o treinamento físico moderado pode atuar, como estímulo ambiental, para as mudanças fenotípicas em fibras de músculos predominantemente oxidativos (sóleo) e predominantemente glicolíticos (EDL). Estas mudanças são particularmente positivas em animais que foram desnutridos no período crítico do desenvolvimento. Assim, o treinamento físico moderado atenua os impactos da desnutrição mantendo a proporção normal de fibras oxidativas e afetando minimamente a proporção de fibras glicolíticas.

9. REFERÊNCIAS

- ALLAF, O., F. GOUBEL, *et al.* A curve-fitting procedure to explain changes in muscle force-velocity relationship induced by hyperactivity. J Biomech, v.35, n.6, Jun, p.797-802. 2002.
- ALMEIDA-SILVEIRA, M. I., D. LAMBERTZ, *et al.* Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon. Eur J Appl Physiol, v.81, n.3, Feb, p.252-7. 2000.
- ALMEIDA-SILVEIRA, M. I., C. PEROT, *et al.* Neuromuscular adaptations in rats trained by muscle stretch-shortening. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, v.72, n.3, p.261-6. 1996.
- AMORIM, M. F., J. A. DOS SANTOS, *et al.* Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? Exp Physiol, v.94, n.8, Aug, p.906-13. 2009.
- BARKER, D. J. Early growth and cardiovascular disease. Archives of disease in childhood, v.80, n.4, Apr, p.305-7. 1999.
- _____. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med, v.261, n.5, May, p.412-7. 2007.
- BARKER, D. J., C. OSMOND, *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ (Clinical research ed.), v.298, n.6673, Mar 4, p.564-7. 1989.
- BARRETO-MEDEIROS, J., A. QUEIROS-SANTOS, *et al.* Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. Neuroimmunomodulation, v.14, n.5, p.229-334. 2007.
- BARROS, K. M., R. MANHAES-DE-CASTRO, *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. Nutri Neurosci, v.9, n.1-2, Feb-Apr, p.99-104. 2006.
- BAYOL, S., D. JONES, *et al.* The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. The British journal of nutrition, v.91, n.3, Mar, p.331-9. 2004.
- BERNEY, D. M., M. DESAI, *et al.* The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. J Pathol, v.183, n.1, Sep, p.109-15. 1997.
- BIGARD, A. X., C. JANMOT, *et al.* Changes in myosin heavy chain profile of mature regenerated muscle with endurance training in rat. Acta Physiol Scand, v.165, n.2, Feb, p.185-92. 1999.
- BIGARD, X. A., C. JANMOT, *et al.* Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. J Appl Physiol, v.81, n.6, Dec, p.2658-65. 1996.

- BRAMELD, J. M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. Br J Nutr, v.91, n.3, Mar, p.327-8. 2004.
- BROOKE, M. H. E. K. K. KAISER. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. J Histochem Cytochem, v.18, n.9, Sep, p.670-2. 1970.
- BUSCHER, D. E. J. C. IZPISUA BELMONTE. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. Cell Tissue Res, v.296, n.1, Apr, p.131-9. 1999.
- CAMPOS, G. E., T. J. LUECKE, *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, Nov, p.50-60. 2002.
- CORNU, C., M. I. ALMEIDA SILVEIRA, *et al.* Influence of plyometric training on the mechanical impedance of the human ankle joint. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, v.76, n.3, p.282-8. 1997.
- COSSU, G., R. KELLY, *et al.* Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. Development, v.122, n.2, Feb, p.429-37. 1996.
- COSTA-CRUZ, R. R., A. AMANCIO-DOS-SANTOS, *et al.* Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. Neurosci Lett, v.401, n.3, Jul 3, p.271-5. 2006.
- COTTRELL, E. C. E. S. E. OZANNE. Early life programming of obesity and metabolic disease. Physiol Behav, v.94, n.1, Apr 22, p.17-28. 2008.
- CRIPPS, R. L., Z. A. ARCHER, *et al.* Early life programming of energy balance. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1203-4. 2007.
- DAHMANE, R., S. DJORDJEVIC, *et al.* Adaptive potential of human biceps femoris muscle demonstrated by histochemical, immunohistochemical and mechanomyographical methods. Med Biol Eng Comput, v.44, n.11, Nov, p.999-1006. 2006.
- DE MOURA, E. G., P. C. LISBOA, *et al.* Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. J Nutr Biochem, v.18, n.2, Feb, p.134-9. 2007.
- DE MOURA, E. G. E. M. C. PASSOS. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. Biosci Rep, v.25, n.3-4, Jun-Aug, p.251-69. 2005.
- DESAI, M., N. J. CROWTHER, *et al.* Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. Biochem Soc Trans, v.23, n.2, May, p.331-5. 1995.

DO MONTE-SILVA, K. K., F. L. ASSIS, *et al.* Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. Nutr Neurosci, v.10, n.3-4, Jun-Aug, p.187-94. 2007.

DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9. 1964.

FAHEY, A. J., J. M. BRAMELD, *et al.* The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. J Anim Sci, v.83, n.11, Nov, p.2564-71. 2005a.

_____. Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. J Anim Sci, v.83, n.10, Oct, p.2330-8. 2005b.

FERNANDEZ-TWINN, D. S., S. E. OZANNE, *et al.* The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. Br J Nutr, v.90, n.4, Oct, p.815-22. 2003.

FLORENCIO, T. T., H. S. FERREIRA, *et al.* Food consumed does not account for the higher prevalence of obesity among stunted adults in a very-low-income population in the Northeast of Brazil (Maceio, Alagoas). Eur J Clin Nutr, v.57, n.11, Nov, p.1437-46. 2003.

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

GOMES, R. J., C. A. DE OLIVEIRA, *et al.* Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. Hippocampus, May 12. 2009.

GOODYEAR, L. J. E B. B. KAHN. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. Annu Rev Med, v.49, p.235-61. 1998.

GOUBEL, F. Changes in mechanical properties of human muscle as a result of spaceflight. Int J Sports Med, v.18 Suppl 4, Oct, p.S285-7. 1997.

HIRABARA, S. M., L. R. SILVEIRA, *et al.* Role of fatty acids in the transition from anaerobic to aerobic metabolism in skeletal muscle during exercise. Cell Biochem Funct, v.24, n.6, Nov-Dec, p.475-81. 2006.

HOPPE, C. C., R. G. EVANS, *et al.* Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.292, n.1, Jan, p.R462-9. 2007.

HORTON, E. S. Metabolic aspects of exercise and weight reduction. Med Sci Sports Exerc, v.18, n.1, Feb, p.10-8. 1986.

HOSTLER, D., C. I. SCHWIRIAN, *et al.* Skeletal muscle adaptations in elastic resistance-trained young men and women. Eur J Appl Physiol, v.86, n.2, Dec, p.112-8. 2001.

IRVING, B. A., J. Y. WELTMAN, *et al.* Effects of exercise training intensity on nocturnal growth hormone secretion in obese adults with the metabolic syndrome. J Clin Endocrinol Metab, v.94, n.6, Jun, p.1979-86. 2009.

ISHIHARA, A. E S. TAGUCHI. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. Jpn J Physiol, v.41, n.2, p.251-8. 1991.

JENSEN, C. B., H. STORGAARD, *et al.* Altered skeletal muscle fiber composition and size precede whole-body insulin resistance in young men with low birth weight. J Clin Endocrinol Metab, v.92, n.4, Apr, p.1530-4. 2007.

KARIYA, F., H. YAMAUCHI, *et al.* Effects of prolonged voluntary wheel-running on muscle structure and function in rat skeletal muscle. Eur J Appl Physiol, v.92, n.1-2, Jun, p.90-7. 2004.

KENSARA, O. A., S. A. WOOTTON, *et al.* Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. Am J Clin Nutr, v.82, n.5, Nov, p.980-7. 2005.

LAMBERTZ, D., F. GOUBEL, *et al.* Influence of long-term spaceflight on neuromechanical properties of muscles in humans. J Appl Physiol, v.94, n.2, Feb, p.490-8. 2003.

LEANDRO, C. G., T. M. DE LIMA, *et al.* Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. Neuroimmunomodulation, v.14, n.1, p.4-7. 2007.

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

LESAGE, J., D. HAHN, *et al.* Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. J Endocrinol, v.174, n.1, Jul, p.37-43. 2002.

LOPES DE SOUZA, S., R. OROZCO-SOLIS, *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. Eur J Neurosci, v.27, n.6, Mar, p.1400-8. 2008.

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

_____. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. Arch Dis Child, v.71, n.4, Oct, p.288-90. 1994.

LUGINBUHL, A. J., G. A. DUDLEY, *et al.* Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. Histochemistry, v.81, n.1, p.55-8. 1984.

- MALLINSON, J. E., D. V. SCULLEY, *et al.* Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. Br J Nutr, v.98, n.2, Aug, p.292-9. 2007.
- MALTIN, C. A., M. I. DELDAY, *et al.* Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. Reproduction, v.122, n.3, Sep, p.359-74. 2001.
- MARTIN-GRONERT, M. S., J. L. TARRY-ADKINS, *et al.* Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.294, n.2, Feb, p.R494-500. 2008.
- MARTIN, R. J., G. J. HAUSMAN, *et al.* Regulation of adipose cell development in utero. Proc Soc Exp Biol Med, v.219, n.3, Dec, p.200-10. 1998.
- MCCANCE, R. A. Food, growth, and time. Lancet, v.2, Oct 6, p.671-6. 1962.
- OZANNE, S. E., G. S. OLSEN, *et al.* Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. J Endocrinol, v.177, n.2, May, p.235-41. 2003.
- PARENTE, V., G. D'ANTONA, *et al.* Long-term resistance training improves force and unloaded shortening velocity of single muscle fibres of elderly women. Eur J Appl Physiol, v.104, n.5, Nov, p.885-93. 2008.
- PASSOS, M. C., F. P. TOSTE, *et al.* Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. Br J Nutr, Aug 5, p.1-7. 2008.
- PESTRONK, G. J., K. K. KAISER, *et al.* ATPase stain in muscle histochemistry. Muscle Nerve, v.15, n.2, Feb, p.258. 1992.
- PETRIK, J., B. REUSENS, *et al.* A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. Endocrinology, v.140, n.10, Oct, p.4861-73. 1999.
- PIRES-DE-MELO, I. H., F. WANDERLEY DOS REIS, *et al.* Short- and long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the morphology of the larynx. Nutrition, v.25, n.7-8, Jul-Aug, p.855-60. 2009.
- RAVELLI, G. P., Z. A. STEIN, *et al.* Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. N Engl J Med, v.295, n.7, Aug 12, p.349-53. 1976.
- REEVES, P. G., F. H. NIELSEN, *et al.* 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, Nov, p.1939-51. 1993.

- ROCKL, K. S., M. F. HIRSHMAN, *et al.* Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. Diabetes, v.56, n.8, Aug, p.2062-9. 2007.
- SAWAYA, A. L., G. DALLAL, *et al.* Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. Obes Res, v.3 Suppl 2, Sep, p.107s-115s. 1995.
- SAWAYA, A. L., P. A. MARTINS, *et al.* Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. Nutr Rev, v.62, n.7 Pt 2, Jul, p.S127-33. 2004.
- SAYER, A. A. E. C. COOPER. Fetal programming of body composition and musculoskeletal development. Early Hum Dev, v.81, n.9, Sep, p.735-44. 2005.
- SETIA, S. E. M. G. SRIDHAR. Changes in GH/IGF-1 Axis in Intrauterine Growth Retardation: Consequences of Fetal Programming? Horm Metab Res, Jul 21. 2009.
- SICHERI, R., A. S. MOURA, *et al.* [Nutritional status of children and occupational categories of the family in a rural community of Parana, Brazil]. Cad Saude Publica, v.9 Suppl 1, p.28-35. 1993.
- SILVEIRA, L., S. M. HIRABARA, *et al.* Effect of lipid infusion on metabolism and force of rat skeletal muscles during intense contractions. Cell Physiol Biochem, v.20, n.1-4, p.213-26. 2007.
- SILVEIRA, L. R., J. FIAMONCINI, *et al.* Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. J Cell Physiol, v.217, n.1, Oct, p.1-12. 2008.
- SULLIVAN, L. Obesity, diabetes mellitus and physical activity--metabolic responses to physical training in adipose and muscle tissues. Ann Clin Res, v.14 Suppl 34, p.51-62. 1982.
- SUN, Z., L. LIU, *et al.* Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. Front Biosci, v.13, p.4765-94. 2008.
- TAJBAKSH, S., U. BORELLO, *et al.* Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. Development, v.125, n.21, Nov, p.4155-62. 1998.
- TANNER, C. J., H. A. BARAKAT, *et al.* Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.282, n.6, Jun, p.E1191-6. 2002.
- TERZIS, G., B. STATTIN, *et al.* Upper body training and the triceps brachii muscle of elite cross country skiers. Scand J Med Sci Sports, v.16, n.2, Apr, p.121-6. 2006.
- TOMITA, M., I. SHIMOKAWA, *et al.* Modulation by dietary restriction in gene expression related to insulin-like growth factor-1 in rat muscle. Aging (Milano), v.13, n.4, Aug, p.273-81. 2001.

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

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

VISSING, K., M. BRINK, *et al.* Muscle adaptations to plyometric vs. resistance training in untrained young men. J Strength Cond Res, v.22, n.6, Nov, p.1799-810. 2008.

WILSON, M. R. E S. J. HUGHES. The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. J Endocrinol, v.154, n.1, Jul, p.177-85. 1997.

WILSON, S. J., J. J. ROSS, *et al.* A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. Development, v.102, n.4, Apr, p.815-21. 1988.

ZAMBRANO, E., G. L. RODRIGUEZ-GONZALEZ, *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. J Physiol, v.563, n.Pt 1, Feb 15, p.275-84. 2005.

ANEXO I

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fone: (55 81) 2126 9940 / 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8390
 www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 99/07

Recife, 19 de setembro de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
 Para: **Profa. Carol Virginia Góis Leandro**
 Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE
 Processo nº 008676/2007-48

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "INDUÇÃO DE PROGRAMAÇÃO FETAL PELA DESNUTRIÇÃO E PELO TREINAMENTO EM RATOS: ESTUDO DE PARÂMETROS SOMÁTICOS, NEUROMOTORES E BIOQUÍMICOS DE FÊMEAS E DA SUA PROLE".

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 CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1998, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

Silvia Carneiro
 Prof. Silvia Carneiro do Nascimento
 CEEA
 UFPE
 Presidente CEEA

 CCB: Integrar para desenvolver

AOL