



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBICO NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

Jéssica Silvino Valente

Discente

Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai

Orientadora

BOTUCATU – SP
Ano 2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBICO NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

Jéssica Silvino Valente

Discente

Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai

Orientadora

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
Ano 2023**

V154e Valente, Jéssica Silvino
Efeitos do exercício aeróbico no músculo esquelético de ratos adultos submetidos à restrição proteica perinatal / Jéssica Silvino Valente. -- Botucatu, 2023
129 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Maeli Dal Pai

1. Tecido muscular. 2. Restrição proteica materna. 3. Exercício físico aeróbico. 4. Glicose. 5. Análise proteômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a minha fé e aos meus sonhos, que insistem em permanecerem firmes até conquistarmos tudo que desejamos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e persistência nesses 4 anos, certamente Ele tem planos que desconhecemos, e nos possibilita coisas que jamais imaginamos. Obrigada por sempre me carregar no colo, me ajudando a passar por todos os momentos que me tornaram a mulher que sou hoje.

Agradeço à minha família, ao meu pai Edson, que mesmo em outro plano continua a caminhar comigo, minha mãe Teresa, irmãos Rafaela, Marcela e Lucas, e tios Vera e Craveiro, por absolutamente tudo que não cabe nessas linhas, por não existirem palavras que descrevam o que vocês são e fazem por mim, quero que saibam que eu estarei aqui por vocês para sempre!

Dentre todas as amizades que fiz, agradeço especialmente minhas amigas Ariana e Ketlin por cada momento compartilhado, as conversas científicas e momentos de distração, vocês tornaram mais leve os dias mais escuros que tive, obrigada por ficarem comigo. Ao meu amigo Alexandre pela paciência em me ensinar mil vezes a diferença entre os tipos de exercício físico, e sempre ser presente para mim, valeu “parça”! Ao “Meu Time”, Andy, Conceição, Luiza, Thais e Thayná, que me acompanham na minha paixão pela corrida, me mostrando que o esporte é muito mais que competição, espero continuar cruzando o pórtico de chegada com todos vocês!

Aos membros do grupo LBME, e minha Orientadora Dr^a Maeli Dal Pai, a todos vocês meu imenso obrigada!

Aos funcionários do setor de Morfologia, do departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do IBB, por serem prestativos e estarem sempre presentes nos auxiliando sempre que preciso, e a UNESP, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O tecido muscular possui uma capacidade de modulação fenotípica frente a diferentes estímulos (positivos ou negativos), alterando suas características metabólicas, funcionais e morfológicas. Sendo o maior órgão metabólico de armazenamento energético do corpo e de grande importância para locomoção e sustentação corporal, o entendimento da influência de estímulos diretos para essas características é de alta relevância. A restrição proteica materna (RPM) durante os estágios iniciais da vida (gestação e/ou lactação) leva a alterações no desenvolvimento fetal e adaptações fisiológicas da prole durante toda a vida, as quais envolvem distúrbios metabólicos sistêmicos, como obesidade e diabetes, além de alterações em diversos sistemas, como o músculo estriado esquelético. Por outro lado, sabe-se que a prática regular de exercício físico é benéfica para o organismo em resposta a diferentes doenças, sendo possível sua utilização como estratégia terapêutica para as alterações musculares derivadas da RPM. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do exercício físico aeróbico (EFA) nos músculos Sóleo (SOL), com metabolismo oxidativo/contração lenta, e Plantar (PL), com metabolismo glicolítico/contração rápida, em ratos adultos submetidos à RPM nos períodos de gestação e lactação. Foram utilizados ratos machos *Sprague Dawley*, provenientes de genitoras submetidas às dietas normocalóricas proteicas padrão (17%-controle) ou hipoproteica (6%-restrito) durante toda gestação e lactação. No dia pós-natal (DPN) 90, os animais foram divididos nos grupos experimentais: Controle Sedentário (CS); Controle Treinado (CT); Restrito Sedentário (RS) e Restrito Treinado (RT). Os animais dos grupos treinados foram submetidos ao protocolo de EFA de natação (oito semanas) com tempo/carga progressivos semanalmente, até completar as primeiras três semanas, com tempo/carga máxima nas últimas cinco semanas. No DPN 150, os animais foram anestesiados e sacrificados (morte humanitária), amostras dos músculos SOL e PL foram coletadas e processadas para as análises morfométrica (n=8), molecular (n=8), bioquímica (n=8) e proteômica (n=3). Os animais foram pesados durante todo o protocolo experimental (DPN 0, 21, 90, 120 e 150), e o teste oral de tolerância a glicose oral (TOTG) foi realizado no DPN 150. Os animais do grupo RS apresentaram um ganho de peso maior que os animais dos grupos controles (CS e CT), o qual foi menos acentuado nos animais RT. Os animais do grupo RS (vs CS) mantiveram as concentrações de glicose sanguínea elevada durante todo o TOTG, e aos 60min, os níveis glicêmicos foram reduzidos nos animais do grupo RT (vs RS). Os músculos SOL e PL apresentaram aumento na área de secção transversal das fibras musculares nos grupos RS (vs CS) e uma diminuição nos animais RT (vs RS). O músculo

SOL apresentou uma diminuição na expressão gênica dos marcadores catabólicos *Mafbx* e *Murf1* nos grupos RS (vs CS), e o grupo RT (vs RS) apresentou aumento no mRNA *Mafbx* e diminuição na expressão do marcador catabólico *Igf1*; a expressão gênica dos marcadores de metabolismo oxidativo *Cs* e glicolítico *Ldha* diminuiu nos animais dos grupos CT e RS (vs CS). Não foram observadas diferenças estatísticas nos genes analisados, no músculo PL. A análise de glicogênio muscular mostrou aumento nos níveis, nos animais do grupo RS, seguido de diminuição nos animais do grupo RT no músculo SOL, sem alterações no músculo PL. A análise do Proteoma apontou 57 e 33 proteínas diferencialmente expressas, no músculo SOL e PL, respectivamente, comuns entre as comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS, as quais enriqueceram majoritariamente, o metabolismo energético muscular, com destaque para a via da glicólise e glicogênio. Concluimos que a RPM causou o efeito de crescimento acelerado corporal e muscular, levou à diminuição da oxidação da glicose com acúmulo de glicogênio no músculo SOL, e exacerbou a oxidação da glicose e o catabolismo do glicogênio no músculo PL. O EFA atenuou o efeito de crescimento acelerado e as alterações metabólicas glicolíticas no músculo SOL, intensificando esta via, no músculo PL.

Palavras-chave: Tecido muscular; Restrição proteica materna; Exercício físico aeróbico; Glicose; Análise proteômica.

ABSTRACT

Muscle tissue has a capacity for phenotypic modulation due to different stimuli (positive or negative), changing its metabolic, functional, and morphological characteristics. The skeletal muscle is the most significant metabolic organ for amino acid storage and, it has significant importance for locomotion and body support. Thus, understanding the influence of direct stimuli on muscle characteristics is highly relevant. Maternal protein restriction (MPR) during the early stages of life (pregnancy and/or lactation) leads to changes in fetal development and physiological adaptations in offspring throughout life, which involve systemic metabolic disorders such as obesity and diabetes, in addition to changes in several systems, such as skeletal muscle. On the other hand, it is known that regular physical exercise is beneficial for the body in response to different pathologies, making it possible to use as a therapeutic strategy for muscle alterations derived from MPR. The aim of this study was to analyze the effects of aerobic exercise (AE) on the Soleus (SOL) muscle which possesses oxidative metabolism/slow contraction, and Plantar (PL) muscle which has glycolytic metabolism/fast contraction, in adult rats submitted to MPR during pregnancy and lactation. Male Sprague Dawley rats from mothers submitted to norm caloric protein (17%-control) or low-protein (6%-restricted) diets throughout pregnancy and lactation were used. On a postnatal day (PD) 90, the animals were divided into experimental groups: Sedentary Control (SC); Trained Control (TC); Sedentary Restricted (SR) and Trained Restricted (TR). The animals of the trained groups were submitted to the AE protocol of swimming (8 weeks) with progressive time/load weekly, until completing the first 3 weeks, with maximum time/load in the last 5 weeks. At PD 150, the animals were anesthetized and sacrificed (humane death), and samples of the SOL and PL muscles were collected and processed for morphometric (n=8), molecular (n=8), biochemical (n=8) and proteomic (n=3) analyzes. The animals were weighed throughout the experimental protocol (PD 0, 21, 90, 120, and 150), and the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at PD 150. The animals in the SR group showed a superior weight gain compared to the animals of the control groups (SC and TC), and this parameter was less pronounced in the TR animals. The animals in the SR group (vs SC) maintained high blood glucose concentrations throughout the OGTT, and at 60 min the glycemic levels were reduced in the animals of the TR group (vs SR). The cross-sectional area of muscle fibers in SOL and PL muscles increased in the SR groups (vs SC) and decreased in the TR animals (vs SR). The SOL muscle showed a decrease in the gene expression of the catabolic markers *Mafbx* and *Murf1* in the SR groups (vs SC), and the TR group (vs SR)

showed an increase in Mafbx mRNA and a decrease in the expression of the anabolic marker Igf1; gene expression of oxidative metabolism markers Cs and glycolytic Ldha decreased in animals from TC and SR groups (vs SC). No statistical differences were observed in the genes analyzed in the PL muscle. The muscle glycogen increased in the animals of the SR group, followed by a decrease in the animals of the TR group in the SOL muscle, without changes in the PL muscle. The Proteome analysis showed 57 and 33 differentially expressed proteins, in the SOL and PL muscle, respectively, common between the TCxSC, SRxSC, and TRxSR comparisons, which mostly enriched muscle energy metabolism, with emphasis on the glycolysis and glycogen pathway. We conclude that MPR caused the catch-up effect of body and muscle growth, led to decreased glucose oxidation with glycogen accumulation in the SOL muscle and intensified glucose oxidation and glycogen catabolism in the PL muscle. AE attenuated the catch-up growth effect and the glycolytic metabolic changes in the SOL muscle, intensifying the effects related to this pathway in the PL muscle.

Keywords: Muscle tissue; Maternal protein restriction; Aerobic exercise; Glucose; Proteomic analysis.

LISTA DE ABREVIACÕES

- 1
- 2
- 3 ACADS – Acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta
- 4 ACOX₂ – Peroxissomal acil-CoA oxidase 2
- 5 ALDOA – Frutose-bifosfato aldolase A
- 6 ALDOC – Frutose-bifosfato aldolase C
- 7 AST – Área de secção transversal
- 8 ADP – Adenosina difosfato
- 9 ATP – Adenosina trifosfato
- 10 ATP5F1A – Subunidade α da ATP sintase
- 11 ATP5F1B – Subunidade β da ATP sintase
- 12 AUC – Área sobre a curva
- 13 CEUA – Comissão de ética no uso de animais
- 14 CO₂ – Dióxido de carbono
- 15 COBEA – Colégio brasileiro de experimentação animal
- 16 CS – Controle sedentário
- 17 CS ou Cs – Citrato sintase
- 18 CT – Controle treinado
- 19 DAG – Distância ano-genital
- 20 DOHaD – Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença
- 21 DPN – Dia pós-natal
- 22 ECHS – Enoil-CoA hidratase
- 23 EDL – Extensor longo dos dedos
- 24 EFA – Exercício físico aeróbico
- 25 ENO – Enolase
- 26 FADH₂ – Flavina adenina nucleotídeo
- 27 GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- 28 GLUT4 – Transportador de glicose tipo 4
- 29 GP ou PYGM – Glicogênio fosforilase
- 30 GPI – Glicose-6-fosfato isomerase
- 31 GS ou GYS1 – Glicogênio sintase
- 32 HAD – Hidroxiacil-CoA desidrogenase
- 33 HK – Hexoquinase
- 34 Igf1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

- 35 LDHA ou Ldha – Lactato desidrogenase A
- 36 Mafbx – Atrogina 1
- 37 MTC – Transportador de monocarboxilato
- 38 MTCO2 – subunidade 2 da citocromo c oxidase
- 39 Murf1 –Proteína ubiquitina ligase E3
- 40 MyHC – Cadeia pesada de miosina
- 41 Myog – Miogenina
- 42 MS – Espectrômetro de massas
- 43 NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- 44 PAS – Ácido Periódico-Schiff
- 45 PDE – Proteína diferencialmente expressa
- 46 PDHC – Complexo piruvato desidrogenase
- 47 PDK – Piruvato desidrogenase quinase
- 48 PFK – Fosfofrutoquinase
- 49 PGAM –Fosfoglicerato mutase
- 50 Pgc1 α – Coativador gama do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 α
- 51 PGK – Fosfoglicerato quinase
- 52 PGM1 – Fosfoglicomutase-1
- 53 PK – Piruvato quinase
- 54 PL – Plantar
- 55 Ppia – Peptidil-prolil cis-trans isomerase A
- 56 Ppib – Peptidil-prolil cis-trans isomerase B
- 57 RPM – Restrição proteica materna
- 58 RS – Restrito sedentário
- 59 RT – Restrito treinado
- 60 RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa
- 61 SOL – Sóleo
- 62 TCA – Ciclo do ácido cítrico
- 63 THIO – Tiolase
- 64 TPI1 – Triosefosfato isomerase
- 65 TOTG – Teste oral de tolerância a glicose
- 66 UDP – Uridina 5'-difosfato
- 67 UQCRC1 – Subunidade 1 do complexo citocromo b-c1

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Cortes de lâminas histológicas do tecido muscular estriado esquelético coradas com Hematoxilina e Eosina. **A.** Corte longitudinal do tecido muscular; fonte: Histology Guide. **B.** Corte transversal do tecido muscular; autoria própria. Fibra muscular (asterisco), núcleo (círculo), estriações musculares (seta) e matriz extracelular (cabeça da seta). 19

Figura 2. Esquema representativo geral da via metabólica glicolítica no tecido muscular estriado esquelético. Setas vermelhas indicam reações de regulação da via glicolítica. MCT: transportador de monocarboxilato; GLUT4: transportador de glicose tipo 4, ATP: adenosina trifosfato; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo. Enzimas da via da glicose em rosa claro - HK: hexoquinase, GPI: fosfoglicose isomerase, PFK: fosfofrutoquinase, ALDOA: frutose-1,6-bifosfato aldolase, TPI: triose-fosfato-isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGAM: fosfoglicerato mutase, ENO: enolase, PK: piruvato quinase. Enzima da via do lactato em rosa escuro: LDH: lactato desidrogenase. Enzimas da via do glicogênio em lilás: PGM: fosfoglicomutase, GS: glicogênio sintase e GP: glicogênio fosforilase. 23

Figura 3. Esquema representativo geral da via metabólica oxidativa no tecido muscular estriado esquelético. Seta vermelha indica reação de regulação da via oxidativa. ATP: adenosina trifosfato; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo; PDHC: complexo piruvato desidrogenase; PDK: piruvato desidrogenase quinase. 29

Figura 4. Resumo da linha do tempo das hipóteses propostas. 33

Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental utilizado. DPN: Dia pós-natal; CS: Controle sedentário; CT: Controle treinado; RS: Restrito sedentário e RT: Restrito treinado 41

Figura 6. A. Tanque de treinamento dos animais. **B.** Adaptação dos animais. 42

Figura 7. A. Esquema representativo do protocolo de treinamento dos animais. **B.** Pesos adicionados aos animais para a determinação da intensidade do exercício físico aeróbico. 43

Figura 8. Gráficos representativos dos testes de Limiar de Lactato sanguíneo dos grupos treinados. **A.** Testes I, II e III de um animal do grupo controle. **B.** Testes I, II e III de um animal do grupo restrito. Setas indicam o ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo de cada grupo. 45

Figura 9. Imagem representativa dos grupos controle e restrito. À esquerda de cada foto, animal do grupo restrito e à direita, animal do grupo controle. **A.** Animais ao nascimento (DPN 0). **B.** Animais no DPN 21. DPN: dia pós-natal. 54

Figura 10. Teste de tolerância à glicose oral (TTGO) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. **A.** Glicemia (mg/dL). **B.** Área sob a curva (AUC). Valores em média±SEM, Anova Two-Way com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS:

restrito sedentário; RT: restrito treinado. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, μ vs CT $p < 0,05$ e α vs RS $p < 0,05$ 56

Figura 11. Corte transversal do músculo Sóleo (SOL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos circulares, endomísio (seta), perimísio (cabeça de seta). Escala: 100 μ m. 57

Figura 12. Corte transversal do músculo Plantar (PL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Hematoxilina e Eosina (HE). Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos circulares, endomísio (seta), perimísio (cabeça de seta). Escala: 100 μ m. 58

Figura 13. Área de Secção Transversal (AST) (μ m²) das fibras musculares dos animais dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Músculo SOL. **B.** Músculo PL. Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; PL: plantar; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p < 0,05$ e α vs RS $p < 0,05$ 58

Figura 14. Corte transversal do músculo Sóleo (SOL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Ácido Periódico Schiff (PAS). Algarismos arábicos indicam a intensidade da deposição de glicogênio das fibras musculares, 3>2>1. Escala: 200 μ m. 59

Figura 15. Corte transversal do músculo Plantar (PL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Ácido Periódico Schiff (PAS). Algarismos arábicos indicam a intensidade da deposição de glicogênio das fibras musculares, 3>2>1. Escala: 200 μ m. 60

Figura 16. Níveis de glicogênio muscular (mg%) dos animais dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Músculo SOL. **B.** Músculo PL. Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; PL: plantar; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p < 0,05$ e α vs RS $p < 0,05$ 60

Figura 17. Níveis de Expressão gênica do músculo SOL dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Marcadores de catabolismo (Mafbx e Murf1), anabolismo (Igf1) muscular. **B.** Marcadores de metabolismo oxidativo (Cs e Pgc1 α) e glicolítico (Ldha). Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey ou de Dunn. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p < 0,05$; μ vs CT $p < 0,05$; α vs RS $p < 0,05$ 61

Figura 18. Níveis de Expressão gênica do músculo PL dos grupos experimentais aos DPN 150. **A.** Marcadores de catabolismo (Mafbx e Murf1) e anabolismo (Igf1) muscular. **B.** Marcadores de metabolismo oxidativo (Cs e Pgc1 α) e glicolítico (Ldha). Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey ou de Dunn. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; PL: plantar; DPN: dia pós-natal. 62

Figura 19. Linha do tempo contendo o passo a passo realizado com os dados proteômicos dos músculos Sóleo (SOL) e Plantar (PL). 63

Figura 20. Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente expressas (PDEs) nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo SOL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. 63

Figura 21. Termos ontológicos e vias moleculares enriquecidas pelas 57 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo SOL. **A.** Gráfico de barras demonstrando os processos musculares com os números de proteínas. **B.** Gráfico de pizza demonstrando a porcentagem dos termos ontológicos e vias moleculares em cada processo muscular. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. Significativo quando valor de p corrigido $< 0,05$ e $-\log_{10}(p \text{ corrigido}) \geq 2.5$ 66

Figura 22. Redes de interação proteína-proteína das PDEs nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo SOL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas..... 67

Figura 23. Termos ontológicos e vias moleculares do processo de metabolismo das 19 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo SOL. **A.** Gráfico de barras dos termos ontológicos/vias moleculares com os números de proteínas. **B.** Heatmap acoplado ao diagrama de alívio das 19 PDEs comuns entre as comparações e seus respectivos termos ontológicos/vias moleculares. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. 69

Figura 24. Rede de interação proteína-proteína das PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS envolvidas com o processo metabólico, no músculo SOL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Soléo. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas..... 70

Figura 25. Diagrama de Venn com as proteínas diferencialmente expressas (PDEs) nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo PL. CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar..... 71

Figura 26. Termos ontológicos e vias moleculares das 33 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo PL. **A.** Gráfico de barras dos processos musculares com os números de proteínas. **B.** Gráfico de pizza demonstrando a porcentagem dos termos ontológicos e vias moleculares em cada processo muscular. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Significativo quando valor de p corrigido $< 0,05$ e $-\log_{10}(p \text{ corrigido}) \geq 2.5$ 73

Figura 27. Redes de interação proteína-proteína das PDEs nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo PL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas..... 74

Figura 28. Termos ontológicos e vias moleculares do processo de metabolismo das 14 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo PL. **A.** Gráfico de barras dos termos ontológicos/vias moleculares com os números de proteínas. **B.** Heatmap acoplado ao diagrama de alúvio das 14 PDEs comuns entre as comparações e seus respectivos termos ontológicos/vias moleculares. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. 75

Figura 29. Rede de interação proteína-proteína das PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS envolvidas com o processo de metabólico, no músculo PL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas..... 76

Figura 30. Resumo gráfico das vias energéticas alteradas pela restrição proteica materna e pelo exercício físico aeróbico. Setas vermelhas: músculo SOL. Setas rosas: músculo PL. Setas contínuas: vias induzidas. Setas tracejadas: vias diminuídas. Setas grossas: vias exacerbadas. 86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Componentes da ração hipoproteica obtida da empresa PragSoluções	40
Tabela 2. Genes com primers desenhados a partir de sequências publicadas no GenBank	48
Tabela 3. Dados avaliados para as genitoras durante a gestação e lactação.....	53
Tabela 4. Peso (g) e DAG (cm) dos animais controle e restrito, ao nascimento (DPN0) e no DPN 21.....	54
Tabela 5. Peso corporal dos grupos experimentais durante o protocolo de treinamento.....	55
Tabela 6. Dados anatômicos dos animais dos grupos experimentais no DPN 150	55
Tabela 7. Lista das 57 Proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS no músculo Sóleo (SOL)	64
Tabela 8. Lista das 33 proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS no músculo Plantar (PL).....	71

SUMÁRIO

1		
2		
3	1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
4	1.1	Tecido Muscular Estriado Esquelético 18
5	1.1.1	Características Gerais do Tecido Muscular Estriado Esquelético 18
6	1.1.2	Vias Metabólicas Energéticas 21
7	1.1.2.1	<i>Via da Glicose 24</i>
8	1.1.2.2	<i>Via do Lactato..... 25</i>
9	1.1.2.3	<i>Via do Glicogênio 26</i>
10	1.1.2.4	<i>Regulação e Alterações na Homeostase da Via Glicolítica 27</i>
11	1.1.2.5	<i>Outras Vias Energéticas: Metabolismo Oxidativo 28</i>
12	1.2	Estímulos ao Tecido Muscular Estriado Esquelético 31
13	1.2.1	Restrição Proteica Materna..... 32
14	1.2.2	Exercício Físico 34
15	1.3	Análise Proteômica 35
16	2	JUSTIFICATIVA 37
17	3	OBJETIVOS 38
18	3.1	Objetivo Geral..... 38
19	3.2	Objetivos Específicos 38
20	4	METODOLOGIA..... 39
21	4.1	Animais experimentais 39
22	4.2	Restrição Proteica Materna (RPM) 39
23	4.3	Exercício Físico Aeróbico (EFA) 41
24	4.4	Teste de Limiar de Lactato Sanguíneo 43
25	4.5	Parâmetros Biométricos 45
26	4.6	Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) 46
27	4.7	Análises Morfológicas..... 46
28	4.9.1	Extração de RNA com TRIzol (<i>Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA</i>) 47
29	4.9.2	Reação de Transcrição Reversa 47
30	4.9.3	Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) 48
31	4.10	Análise do Proteoma..... 48
32	4.10.1	Preparação das amostras para o Espectrômetro de Massas 49
33	4.10.2	Protocolo Colunas Pierce C18 Spin..... 49
34	4.10.3	Espectrômetro de Massas 49

35	4.10.4	Obtenção das proteínas diferencialmente expressas (PDEs) analisadas.....	50
36	4.10.5	Obtenção dos termos ontológicos, vias moleculares enriquecidas e redes de interação	
37		das PDE comuns entre as três comparações	51
38	4.11	Análise Estatística	51
39	5	RESULTADOS	53
40	5.1	Dados das genitoras	53
41	5.2	Dados da prole.....	53
42	5.2.1	Parâmetros Biométricos.....	53
43	5.2.2	Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	55
44	5.2.3	Análises Morfológicas e Bioquímica.....	56
45	5.2.3.1	Área de Secção Transversal (AST)	56
46	5.2.3.2	Deposição de Glicogênio muscular	58
47	5.2.4	Dados Moleculares: Expressão gênica	60
48	5.2.4.1	Músculo Sóleo (SOL)	61
49	5.2.4.2	Músculo Plantar (PL).....	61
50	5.2.5	Dados moleculares – Proteômica.....	62
51	5.2.5.1	Análise do Proteoma no Músculo SOL	63
52	5.2.5.2	Análise do Proteoma no Músculo PL	70
53	6	DISCUSSÃO	77
54	6.1	Resumo Gráfico	86
55	7	CONCLUSÃO	87
56		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
57		ANEXOS.....	99

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão abordados temas relevantes para esta tese, como as características e importância metabólica do tecido muscular estriado esquelético, e os efeitos dos estímulos da restrição proteica materna e do exercício físico no tecido muscular.

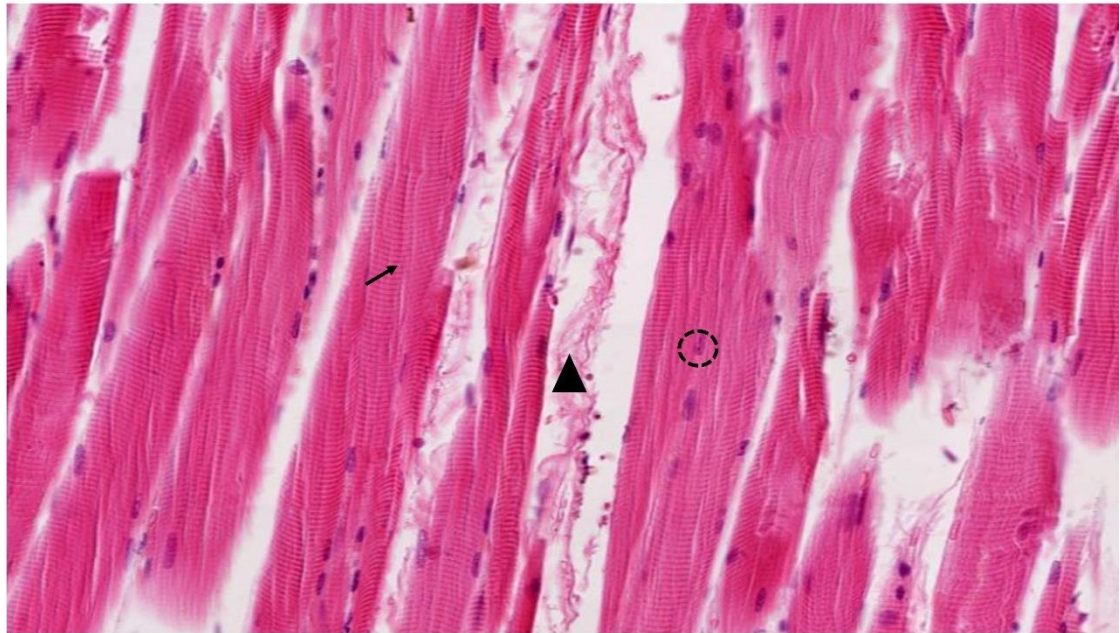
1.1 Tecido Muscular Estriado Esquelético

1.1.1 Características Gerais do Tecido Muscular Estriado Esquelético

O tecido muscular estriado esquelético é o mais abundante do corpo dos mamíferos, constituindo aproximadamente 40-50% do peso corporal total, possuindo funções indispensáveis para a sobrevivência do indivíduo (JENSEN *et al.*, 2011; FRONTERA and OCHALA, 2015; SHARPLES, STEWART and SEABORNE, 2016). Além de auxiliar na respiração, locomoção e sustentação corporal, é produtor de calor e o maior órgão metabólico de armazenamento energético (JENSEN *et al.*, 2011; ROWLAND, BAL and PERIASAMY, 2014; HEARRIS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2021).

Morfologicamente, este tecido é composto por células especializadas, denominadas fibras musculares, de formato alongado, cilíndrico e estriado, compostas por mionúcleos localizados na periferia celular, abaixo da membrana plasmática ou sarcolema (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009). Como suporte estrutural, nutricional e funcional, auxiliando na manutenção da integridade deste tecido e envolvendo as fibras musculares, se encontra a matriz extracelular (STEARNS-REIDER *et al.*, 2017) (Figura 1).

A.



B.

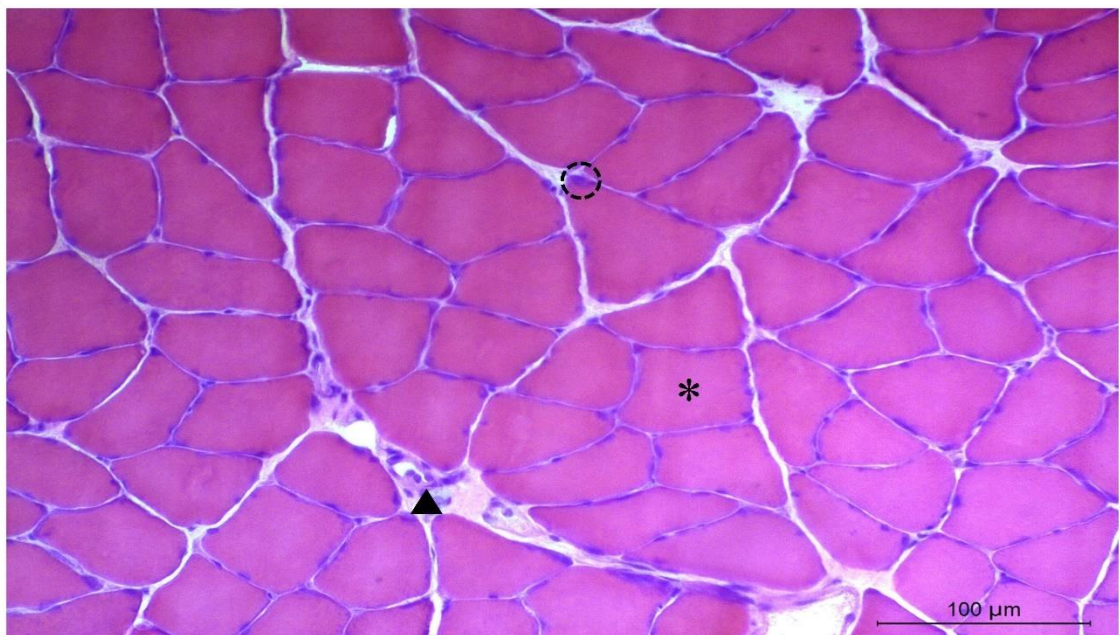


Figura 1. Cortes de lâminas histológicas do tecido muscular estriado esquelético coradas com Hematoxilina e Eosina. **A.** Corte longitudinal do tecido muscular; fonte: *Histology Guide*. **B.** Corte transversal do tecido muscular de rato adulto; autoria própria. Fibra muscular (asterisco), núcleo (círculo), estriações musculares (seta) e matriz extracelular (cabeça da seta).

Unidades contrácteis, repetidamente organizadas, denominadas sarcômeros, dão o aspecto estriado para a fibra muscular, sendo constituídos por proteínas estruturais e contráteis, com destaque para a proteína miosina, responsável pela diferenciação dos tipos de contração muscular (SCHIAFFINO and REGGIANI, 1994; WELLS; SELVADURAI and TIEN, 2009).

As cadeias pesadas de miosina (MyHC) apresentam uma porção globular que contém uma região de ligação com a molécula adenosina trifosfato (ATP), responsável pela atividade ATPase e liberação da energia necessária para a contração muscular (HUXLEY, 1969; LOWEY *et al.*, 1969). Com base na velocidade da atividade ATPase hidrolisando a molécula de ATP na MyHC, as fibras musculares podem apresentar velocidade de contração lenta ou rápida, sendo essa uma das importantes formas de diferenciação dos tipos musculares (SCHIAFFINO and REGGIANI, 1994, 2011; SCHIAFFINO *et al.*, 2013).

Outras características musculares permitem a classificação deste tecido em dois tipos: músculos formados, em sua maioria, por fibras com isoforma de MyHC do tipo I (fibras do tipo I), apresentam grande quantidade de mitocôndrias, maior número de capilares sanguíneos, e por consequência, maior suprimento de oxigênio e nutrientes, com rápida remoção dos produtos do metabolismo, pouco glicogênio armazenado e significativa produção de antioxidantes endógenos, são classificados como músculos de metabolismo oxidativo e de contração lenta (DUBOWITZ and PEARSE, 1960; PETTE and STARON, 2000; SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Músculos que expressam a maioria das isoformas de MyHC do tipo II (fibras do tipo IIA, IIX e IIB), apresentam o metabolismo glicolítico e são geralmente fibras de contração rápida, possuindo poucas mitocôndrias, com irrigação sanguínea e suprimento de oxigênio menores, e com maior armazenamento de glicogênio quando comparadas as fibras oxidativas (SILLAU and BANCHERO, 1978; SÄNGER and STOIBER, 2001; SCHIAFFINO *et al.*, 2013).

Essas características definem o fenótipo e influenciam na demanda do recrutamento muscular: músculos oxidativos e de contração lenta, como o músculo Sóleo (SOL), são requeridos para a realização de atividades contínuas devido sua resistência a fadiga e suporte de capilares, já o músculo Plantar (PL), representante dos músculos glicolíticos e de contração rápida, são recrutados em atividade de explosão e curta duração, pois apresentam apoio metabólico restrito entrando em fadiga mais facilmente.

Em mamíferos, embora passível de modulação, os tipos de fibras musculares são definidos durante a formação das fibras musculares na embriogênese, enquanto o crescimento e manutenção do fenótipo muscular são mantidos após o nascimento e sustentados através da homeostase e *crosstalk* entre vias metabólicas importantes, como as vias de metabolismo oxidativo e glicolítico, além do anabolismo e catabolismo muscular (KELLY and RUBINSTEN, 2003; MCKINNELL and RUDNICK, 2004; WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009).

As vias de crescimento muscular resultam na síntese proteica e, como um importante marcador anabólico, destaca-se o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF1), atuante

na modulação da taxa de síntese e degradação proteica muscular, estimulando a hipertrofia no músculo (MURGIA *et al.*, 2000; BODINE *et al.*, 2001; SARTORELLI and FULCO, 2004). Quando a via de sinalização culmina na degradação das miofibrilas e outras proteínas musculares, ocorre a diminuição (atrofia) da fibra muscular, com perda e/ou redução da força, atrogenes músculo específico são considerados marcadores da via catabólica atuantes em diferentes formas: o MAFBX (Atrogina 1), é responsável por conter a síntese proteica, enquanto o MURF1 (Proteína ubiquitina ligase E3), atua na degradação do citoesqueleto miofibrilar (BODINE *et al.*, 2001; BONALDO and SANDRI, 2013).

A estimulação ou inibição de determinada via molecular pode levar a alterações no fenótipo e fisiologia muscular que influenciam na qualidade de vida dos indivíduos, podendo ser observadas em diferentes condições. Durante o envelhecimento, por exemplo, o aumento dos marcadores catabólicos levam à atrofia acentuada, comprometendo assim a qualidade de vida dos idosos (ZHU *et al.*, 2019); por outro lado, uma suplementação com aminoácidos induz o crescimento muscular pela via de sinalização IGF1 (LEDNEV *et al.*, 2020), enquanto a prática de exercício auxilia na diminuição dos marcadores catabólicos, atenuando a atrofia muscular causada pela insuficiência cardíaca (SOUZA *et al.*, 2014).

1.1.2 Vias Metabólicas Energéticas

As vias de metabolismo energético apresentam grande influência na manutenção do fenótipo muscular, no qual a disponibilidade energética impulsiona vias moleculares complexas responsáveis pela obtenção da energia derivada da quebra de nutrientes ingeridos pela alimentação, para a realização de todas as funções celulares, incluindo a atividade de contração muscular (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009).

Devido ao baixo armazenamento de ATP celular, a oxidação de carboidratos, gorduras e proteínas, resulta na produção necessária de energia para sustentar a fisiologia celular, cujo tipo de substrato e via metabólica a ser ativada e mantida, é depende da disponibilidade de nutrientes, condição fisiológica e/ou intensidade da atividade a ser realizada, bem como atividade enzimática das proteínas catalisadoras (HARGREAVES, 2000; WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009; BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010; OHLENDIECK, 2010). Sob condições dependentes ou não de oxigênio, três metabolismos energéticos são responsáveis pela geração de energia muscular: pelas vias anaeróbicas ocorrem a realização dos sistemas fosfagênico e glicolítico, enquanto o sistema oxidativo ocorre em

condições aeróbicas (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009; BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010).

Quando o fornecimento de energia é restrito às condições anaeróbicas, a produção de ATP é realizada pelo sistema fosfagênico, responsável pela degradação da fosfocreatina catalisada pela enzima creatina quinase, e pela via glicolítica, através da conversão de glicogênio armazenado nas células musculares em glicose e esta em lactato, catalisado pela enzima lactato desidrogenase (LDH) (SPRIET, HOWLETT and HEIGENHAUSER, 2000; WESTERBLAD, BRUTON and KATS, 2010). Além do fornecimento de ATP anaeróbico, pela via glicolítica ocorre a produção da molécula de piruvato proveniente da oxidação da glicose, que resultará na produção de ATP aeróbico pelo sistema oxidativo, composta pelo ciclo do ácido cítrico (TCA) e cadeia respiratória (SPRIET, HOWLETT and HEIGENHAUSER, 2000; EVANS *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2022).

As etapas detalhadas das reações da via glicolítica se encontram no esquema representativo na Figura 2, enquanto os processos envolvendo os principais substratos e enzimas catalíticas serão detalhados nas sessões a seguir.

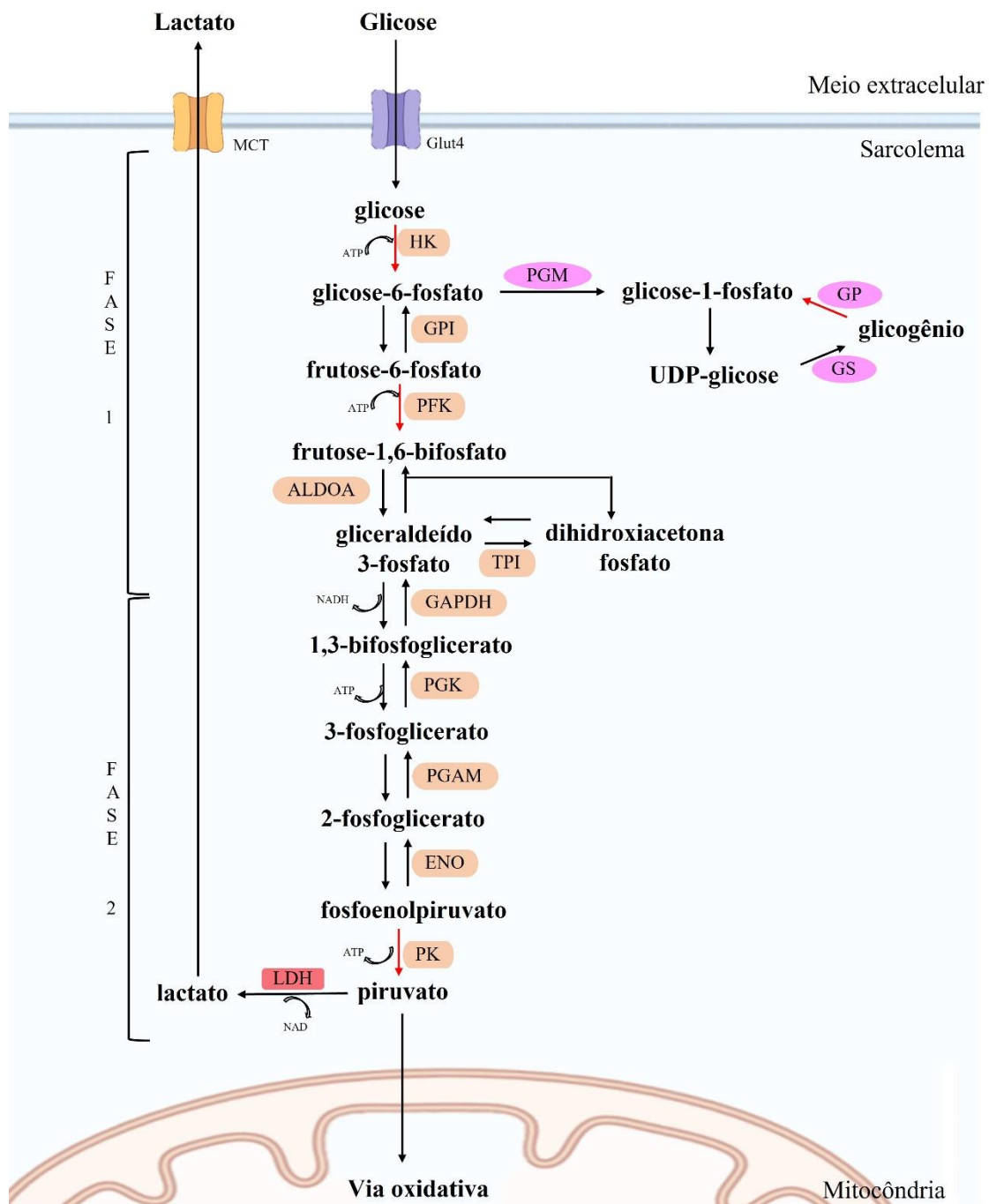


Figura 2. Esquema representativo geral da via metabólica glicolítica no tecido muscular estriado esquelético. Setas vermelhas indicam reações de regulação da via glicolítica. MCT: transportador de monocarboxilato; GLUT4: transportador de glicose tipo 4, ATP: adenosina trifosfato; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo. Enzimas da via da glicose em rosa claro - HK: hexoquinase, GPI: fosfoglicose isomerase, PFK: fosfofrutoquinase, ALDOA: frutose-1,6-bisfosfato aldolase, TPI: triose-fosfato-isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGAM: fosfoglicerato mutase, ENO: enolase, PK: piruvato quinase. Enzima da via do lactato em rosa escuro: LDH: lactato desidrogenase. Enzimas da via do glicogênio em lilás: PGM: fosfoglicomutase, GS: glicogênio sintase e GP: glicogênio fosforilase.

1.1.2.1 Via da Glicose

A glicose é um dos substratos energéticos musculares preferidos, sendo a principal fonte de energia pós prandial, no qual aproximadamente 80% da captação sanguínea é processada pelo tecido muscular, podendo ser oxidada na presença ou ausência de oxigênio gerando energia ou, armazenada em forma de glicogênio muscular ou hepático (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009; JENSEN *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2014; HEARRIS *et al.*, 2018).

Metabolicamente, a glicólise é a via mais rápida de renovação do ATP, composta por 10 processos bioquímicos citoplasmáticos catalisados por 10 enzimas e, didaticamente, é dividida em duas fases referentes ao gasto ou produção energética (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009; BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010; OHLENDIECK, 2010).

As 5 primeiras reações compõem a fase de iniciação ou preparatória, sendo caracterizada pelo consumo de ATP e pela formação de duas trioses gliceraldeído-3-fosfato (OHLENDIECK, 2010; EVANS *et al.*, 2019). Transportadores específicos musculares, como o transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), realizam a passagem da molécula de glicose para o sarcoplasma, no qual a primeira reação reguladora e irreversível da glicólise ocorre após a sua fosforilação decorrente do consumo da primeira molécula de ATP, pela isoenzima muscular hexoquinase II (HK). A molécula formada, glicose-6-fosfato, permanece aprisionada no meio intracelular, podendo também servir de substrato para a glicogênese (OHLENDIECK, 2010; ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016). A segunda reação reguladora e irreversível, também limitante da taxa da glicólise, é a conversão de frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato pela atividade consumidora de ATP da fosfofrutoquinase (PFK). Neste ponto, ocorre o comprometimento deste substrato com a via da glicólise, sendo a terceira reação da via (OHLENDIECK, 2010). Finalizando a primeira fase, duas trioses fosfato, denominadas gliceraldeído-3-fosfato, são formadas pela catálise das enzimas frutose-1,6-bifosfato aldolase (ALDOA) e triose-fosfato-isomerase (TPI), sendo a quarta e quinta reação, respectivamente (OHLENDIECK, 2010).

A segunda fase é definida pela produção de ATP e equivalentes redutores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), necessários para a fosforilação oxidativa pelo metabolismo oxidativo, além da produção de duas moléculas de piruvato (OHLENDIECK, 2010; EVANS *et al.*, 2019). Uma sequência de quatro reações reversíveis envolvendo: a formação do NADH mediada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), produção das duas primeiras moléculas de ATP catalisada pela enzima fosfoglicerato quinase (PGK), rearranjo isomérico molecular pela enzima fosfoglicerato mutase (PGAM) e uma hidrólise mediada pela enolase (ENO), formam a grande parte das reações desta fase (OHLENDIECK, 2010). Por fim,

as moléculas de fosfoenolpiruvato são então convertidas em piruvato, fornecendo as duas últimas moléculas de ATP desta via (totalizando duas moléculas de ATP por molécula de piruvato formada), catalisada pela reação irreversível da enzima piruvato quinase (PK) (OHLENDIECK, 2010).

A molécula de piruvato pode então seguir três vias distintas, agora dependentes da disponibilidade de oxigênio: em condições anaeróbicas, ocorre a redução à lactato ou transporte hepático por transportadores membranares, como o transportador de monocarboxilato (MCT), para a realização da gliconeogênese, ou oxidação gerando energia, água e CO₂ por meio da via oxidativa (HALL, 2016; EVANS *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020).

1.1.2.2 Via do Lactato

Quando a produção de piruvato supera a velocidade mitocondrial de realizar a fosforilação oxidativa, como durante o exercício físico de alta intensidade, parte deste produto é removido do sarcoplasma, enquanto a maioria é convertida em lactato pela ação da enzima LDH (BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010; HALL *et al.*, 2016). Embora não seja produtora da molécula de ATP, a importância muscular desta via se dá, principalmente, devido à manutenção do fluxo da glicólise pela regeneração do NAD⁺, evitando assim o impedimento da formação de ATP em condições anaeróbicas, além do controle da acidose metabólica (BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010).

A enzima LDH, considerada como um indicador do metabolismo anaeróbico, é uma proteína tetramérica, composta de quatro subunidades A e B, puras ou híbridas, sendo expressas, predominantemente no músculo esquelético e principalmente no músculo cardíaco, respectivamente (DAWSON, GOODFRIEND and KAPLAN, 1964; SOUZA *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2016). A LDHA favorece a reação de conversão do piruvato em lactato com formação do NAD⁺, mantendo sua atividade em concentrações altas de piruvato, enquanto a LDHB apresenta sua afinidade máxima com altas concentrações de lactato, favorecendo a reação oposta, convertendo lactato a piruvato e NADH (DAWSON, GOODFRIEND and KAPLAN, 1964).

O tecido muscular produz e oxida lactato em condições de repouso e baixa atividade, contudo, em atividades como exercício físico de alta intensidade, a demanda no consumo de oxigênio aumenta ao passo que a troca gasosa entre os vasos sanguíneos e o tecido muscular não ocorre, impossibilitando a manutenção da obtenção energética pela via oxidativa. Por consequência, ocorre o aumento da demanda pelo metabolismo anaeróbico (glicose-glicogênio-

lactato) para suprimento energético (BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010). O aumento e acúmulo de lactato muscular ou circulante é passível de mensuração, sendo utilizado para a determinação da classificação de exercícios em estudos acadêmicos e performance em atletas. O limiar do ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo, ou seja, o ponto máximo de acúmulo de lactato, corresponde ao limite entre a transição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, no qual exercícios que não ultrapassam o limiar de lactato são classificados como exercícios aeróbicos (WASSERMAN and MCILROY, 1964; VOLTARELLI *et al.*, 2002; VECHETTI-JÚNIOR *et al.*, 2013).

1.1.2.3 Via do Glicogênio

O glicogênio é um polímero ramificado e esférico de armazenamento de glicose, presente no fígado e no tecido muscular, sendo o músculo responsável por aproximadamente 80% deste armazenamento (JENSEN *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2019). Embora o tecido muscular não realize a gliconeogênese, formação de glicose endógena, devido à ausência da enzima glicose 6-fosfatase, o glicogênio muscular é uma fonte de energia rápida para o metabolismo anaeróbico, sendo um substrato energético local para o exercício, além de poder ser oxidado em glicose e posteriormente em lactato e regular outras vias de sinalização (JENSEN *et al.*, 2011; HEARRIS *et al.*, 2018).

Morfologicamente, a maior parte do glicogênio muscular se encontra entre as miofibrilas, seguido das regiões intra-miofibrilar e subsarcolemal; o tipo de fibra também influencia na deposição e utilização deste polissacarídeo, bem como a intensidade e duração da atividade a ser realizada (HEARRIS *et al.*, 2018). Fibras do tipo I apresentam menos glicogênio armazenado comparadas com as fibras do tipo II, enquanto a glicogenólise é mais evidenciada em atividades de recrutamento das fibras do tipo II, como em exercícios de intensidades máximas (HEARRIS *et al.*, 2018).

Embora outras enzimas estejam envolvidas em uma complexa sequência de reações, as vias de síntese e degradação do glicogênio muscular são catalisadas por duas principais proteínas, a glicogênio sintase (GS ou GYS1) e fosforilase (GP ou PYGM) (ROACH *et al.*, 2012; ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016). A glicose-6-fosfato formada pela fosforilação da glicose pela HK, é a molécula em comum que liga a via da glicose e do glicogênio e, níveis aumentados dessa molécula podem indicar excesso na ingestão alimentar e a necessidade de armazenamento da glicose (KIM *et al.*, 2000; HEARRIS *et al.*, 2018). Inicialmente, a enzima fosfoglicomutase-1 (PGM1) realiza a isomerização da glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato,

que é então convertida no doador de glicose, uridina 5'-difosfato (UDP) -glicose, pela enzima UDP-glicose pirofosforilase. A molécula de glicose é então transportada da UDP-glicose pela autoglicosilação da enzima glicogenina, formando uma cadeia curta de glicose, a sequência inicial. A síntese do glicogênio é então iniciada pela GYS1, responsável pelo alongamento da sequência inicial e as ramificações do polímero de glicose são realizadas pela enzima de ramificação (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; EVANS *et al.*, 2019).

Quando em jejum ou durante a prática de exercício físico, cujas demandas energéticas aumentam, a via de glicogenólise é ativada e o glicogênio muscular degradado, para ser metabolizado via glicólise fornecendo energia local (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; EVANS *et al.*, 2019). No sarcoplasma, duas enzimas realizam a quebra do polímero da glicose, a PYGM realiza a liberação da glicose-1-fosfato e a enzima de desramificação libera a glicose livre (ROACH, *et al.*, 2012; ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016).

1.1.2.4 Regulação e Alterações na Homeostase da Via Glicolítica

O tecido muscular é o principal local de armazenamento e eliminação da glicose, sendo indispensável na homeostase metabólica deste carboidrato (JENSEN *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2019; XIANG *et al.*, 2021). Após a ingestão alimentar, o tecido muscular é responsável por absorver 70-90% da glicose sanguínea em indivíduos saudáveis, sendo extremamente importante no controle de doenças metabólicas, como obesidade, diabetes do tipo 2, resistência à insulina e miopatias (KRÜGER *et al.*, 2013; ARAGÃO *et al.*, 2014; EVANS *et al.*, 2019).

A regulação das vias moleculares e, portanto, a manutenção da homeostase das vias metabólicas ocorrem de diferentes maneiras: da perspectiva fisiológica, os fatores influenciadores são a intensidade e duração da atividade/exercício, estado nutricional e disponibilidade do substrato; quanto à atividade enzimática, além da quantidade de enzimas presentes, modificações covalentes, como fosforilação e desfosforilação, alosteria, interação com moléculas sinalizadoras e concentração do substrato auxiliam na homeostase das vias (JENSEN *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2014; HEARRIS *et al.*, 2018).

A via glicolítica é regulada por quatro enzimas catalizadoras das reações irreversíveis, portanto, limitadoras da taxa do fluxo da oxidação da glicose, sendo elas: a HK e PFK na primeira fase, PK na segunda fase da glicólise e a PYGM na glicogenólise (OHLENDIECK, 2010; ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016).

Em humanos, as miopatias metabólicas, doenças de armazenamento de glicogênio e glicose, são derivadas de alterações genéticas em genes que codificam proteínas da via

glicolítica, influenciando diretamente na qualidade de vida, além de comprometer a prática de exercício físico (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; TARNOPOLSKY, 2018). Alterações genéticas na PFKM, causam a doença de Tarui, também conhecida como doença de armazenamento de glicogênio tipo 7, levando ao aumento nos níveis de glicogênio muscular, glicose/frutose-6-fosfato em repouso, além de intolerância ao exercício devido à fadiga precoce (EVANS *et al.*, 2019). Na doença de McArdle, mutações no gene da PYGM levam à diminuição da sua atividade, limitando a disponibilidade de glicose no início da contração muscular, induzindo fadiga e câibras, além do aumento da frequência cardíaca (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016). Alterações genéticas em outras enzimas não regulatórias, como GYS1, PGAM2, ENO3, LDHA, levam à arritmia cardíaca, agregados tubulares, rabdomiólise, além da intolerância ao exercício (TARNOPOLSKY, 2018).

Fatores ambientais, como nutrição e estilo de vida, também induzem as alterações na homeostase da via glicolítica, mudando o padrão ideal de expressão gênica e proteica das enzimas, levando a distúrbios metabólicos, como diabetes e resistência à insulina (JENSEN *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2014; de BRITO ALVES *et al.*, 2017). Da Silva *et al.* (2010) demonstraram, em ratos idosos diabéticos, diminuição da atividade em 45% e 55% das enzimas HK e PFKM, respectivamente. Kim *et al.* (2000) sugerem que o consumo de dietas de alto teor de gordura comprometem o metabolismo da glicose devido aos altos níveis de glicose-6-fosfato e baixa atividade da GS. Por outro lado, Krüger *et al.* (2013) demonstraram que a prática de exercício físico melhora a obtenção energética pelo metabolismo glicolítico, pelo aumento na captação da glicose e na expressão gênica da PFKM, além de diminuir a gordura em ratos adultos.

Portanto, além das funções de locomoção e sustentação do corpo, o tecido muscular esquelético participa de forma significativa na homeostase da glicose sistêmica, fazendo com que o conhecimento e regulação destas vias moleculares sejam de alta relevância (JENSEN *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2019; XIANG *et al.*, 2021).

1.1.2.5 Outras Vias Energéticas: Metabolismo Oxidativo

Após a formação no sarcoplasma e transporte para a mitocôndria, o piruvato sofre uma descarboxilação oxidativa pelo complexo mitocondrial multienzimático piruvato desidrogenase (PDHC), sendo convertido irreversivelmente em acetil-coenzima A (acetil-CoA), formando NADH e CO₂, podendo entrar no TCA seguindo a via oxidativa ou ser substrato para a síntese

lipídica (SPRIET *et al.*, 2000; STRUMILO, 2005; SHI and TU, 2015; DUNFORD *et al.*, 2011; GUDIENSEN *et al.*, 2018) (Figura 3).

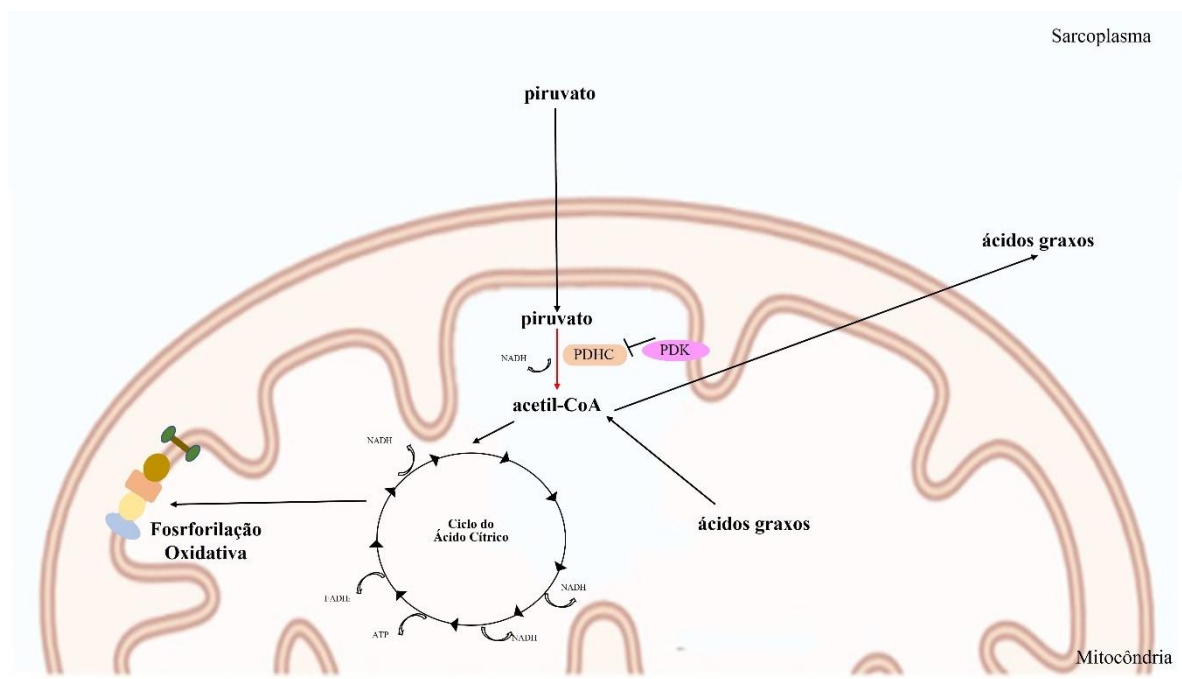


Figura 3. Esquema representativo geral da via metabólica oxidativa no tecido muscular estriado esquelético. Seta vermelha indica reação de regulação da via oxidativa. ATP: adenosina trifosfato; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo; PDHC: complexo piruvato desidrogenase; PDK: piruvato desidrogenase quinase.

O PDHC é um importante regulador da homeostase metabólica central de carboidratos, sendo necessário para a oxidação aeróbica da glicose, atuando como ligante entre a via glicolítica e oxidativa, por meio do ciclo do TCA (DUNFORD *et al.*, 2011; GUDIENSEN *et al.*, 2018; JELINEK and MOXLEY, 2021). Três subunidades catalíticas principais (E1, E2 e E3) formam o complexo, no qual cada subunidade realiza uma etapa da reação (JELINEK and MOXLEY, 2021).

O principal meio de inativação do PDHC ocorre por meio da fosforilação de resíduos de serina, realizada pela enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), no qual três isoformas são expressas no tecido muscular: PDK1, PDK2 e PDK4 (STRUMILO, 2005; LINN, PETTIT and REED, 1969). A regulação negativa do PDHC é considerada como um fator metabólico chave na etiologia do diabetes. Holness *et al.* (2000) demonstraram que dietas com alto teor de gordura aumentam a atividade e expressão proteica da PDK2 e PDK4 muscular, regulando negativamente o PDHC, levando a alteração na via da glicose. Xu *et al.* (2020), observaram que pacientes com insuficiência renal terminal apresentaram um aumento na expressão proteica

de PDK4, levando à inibição da atividade da enzima PDH no músculo esquelético desses pacientes, levando a distúrbios metabólicos musculares.

Assim como outros sistemas, o tecido muscular apresenta uma flexibilidade metabólica, ou seja, a capacidade de alterar o combustível energético a ser oxidado, principalmente glicose ou ácido graxo, para suprir a demanda energética, sendo a disponibilidade de nutrientes uma das principais influenciadoras dessa característica (ZHANG *et al.*, 2014). Além de produto da oxidação do piruvato pela glicólise, a formação de acetil-CoA pode provir do catabolismo de ácidos graxos, sendo esta outra forma de regulação do PDHC e do metabolismo da glicose (SPRIET *et al.*, 2000; LUNDGAARD, FRITZE and KIENS, 2018; FRITZEN, LUNDGAARD and KIENS, 2020).

Os ácidos graxos são uma importante fonte de energia para o tecido muscular, podendo ser transportados diretamente para a mitocôndria quando apresentam cadeias curtas ou médias, ou importados com o auxílio de enzimas específicas, como carnitina palmitoiltransferase, quando apresentam cadeias longas (FRITZEN, LUNDGAARD and KIENS, 2020). A oxidação mitocondrial de ácidos graxo é denominada β -oxidação, composta por quatro etapas, sendo catalisadas por quatro enzimas (acil-CoA desidrogenase - ACADS, enoil-CoA hidratase - ECHS, hidroxiacil-CoA desidrogenase - HAD, e tiolase - THIO). Os ácidos graxos são catabolizados sequencialmente para a formação do acetil-CoA, que então pode seguir para o TCA (LUNDGAARD, FRITZE and KIENS, 2018; FRITZEN, LUNDGAARD and KIENS, 2020).

Com relação ao saldo de moléculas de ATP, a oxidação da glicose em piruvato gera poucas moléculas energéticas sob condições anaeróbicas citoplasmática, enquanto a oxidação aeróbica mitocondrial do piruvato, seguindo o TCA e a fosforilação oxidativa, leva a um maior rendimento produzindo aproximadamente 80% das moléculas de ATP em condições normais (RICH and MARÉCHAL, 2010; PAPA *et al.*, 2012).

O TCA é a principal via final comum para o metabolismo da glicose e ácidos graxos, no qual os grupos acetil dos produtos acetil-CoA são oxidados e transferidos para moléculas de oxaloacetato, em uma sequência de oito reações, formando CO₂, água, e os redutores NADH e FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo) (BOWTELL *et al.*, 2007; RICH and MARÉCHAL, 2010). A primeira enzima limitante do ciclo, a citrato sintase (CS), é comumente usada como um marcador de metabolismo aeróbico, e a deficiência em outras enzimas do ciclo podem levar a diversas doenças, como desordens neurometabólicas, encefalopatias, atrofia ótica, entre outras (BOWTELL *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2021).

Os redutores (NADH e FADH_2) produzidos pela glicólise e TCA são substratos ricos em elétrons que, quando oxidados pela fosforilação oxidativa, geram grande quantidade de energia, proveniente da via oxidativa aeróbica (RICH and MARÉCHAL, 2010). A cadeia transportadora de elétrons está localizada na membrana interna mitocondrial, composta principalmente por 4 complexos, no qual os elétrons transferidos por eles geram a força próton motriz para a síntese de ATP, por meio da ATPsintase ou complexo V, completando o sistema da fosforilação oxidativa (WITTIG and SCHÄGGER, 2009; RICH and MARÉCHAL, 2010).

Resumidamente, o complexo I, também conhecido como NADH: ubiquinona oxidoreductase é responsável pela reoxidação do NAD^+ ; o complexo II (succinato: ubiquinona oxidoreductase) catalisa a oxidação do succinato a fumarato, juntamente com a redução e reoxidação do FAD, no complexo III ou complexo citocromo bc_1 , ocorre a oxidação dos produtos da ubiquinona gerados pelos complexos I e II, com a transferência dos elétrons para o citocromo c, reduzindo-o e, por fim, o complexo IV, denominado citocromo c oxidase, catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio molecular formando a molécula de água (RICH and MARÉCHAL, 2010). O transporte de elétrons entre os complexos leva ao transporte de prótons para o espaço intramembranar, gerando um gradiente de prótons, que é então usado pela ATPsintase para gerar ATP a partir de ADP e fosfato (WITTIG and SCHÄGGER, 2009).

Alguns estímulos, como nutrição inadequada e a prática de exercício físico, levam a alterações mitocondriais sendo frequentemente relacionadas com variações no metabolismo muscular. Zhu *et al.* (2006) sugerem uma diminuição no metabolismo oxidativo muscular da prole de ovelhas submetidas à restrição alimentar durante a gestação devido à diminuição de enzimas mitocondriais, como ATPsintase. Beauchamp *et al.* (2014) observaram uma diminuição na expressão proteica da citocromo c oxidase, bem como a sua atividade, na prole de camundongos submetidos à restrição alimentar gestacional, sugerindo uma diminuição nas funções oxidativas musculares. Por outro lado, Souza *et al.* (2014) sugerem que a prática de exercício melhora o metabolismo oxidativo, e por consequência, desempenho muscular de ratos submetidos à estenose aórtica devido a preservação da atividade da CS.

1.2 Estímulos ao Tecido Muscular Estriado Esquelético

Uma das principais características do tecido muscular é sua capacidade de modulação em resposta a diversos estímulos, os quais podem alterar suas características metabólicas, funcionais e morfológicas, fazendo com que este tecido seja altamente plástico (ARGILÉS *et*

al., 2016; COSTA *et al.*, 2022). Patogenias, estresse, imobilização, envelhecimento, nutrição e exercício físico, são insultos com influência direta no tecido muscular, alterando a regulação intrínseca da expressão de genes e proteínas, promovendo alterações metabólicas e funcionais, prejudiciais ou adaptativas ao tecido estriado esquelético (VECHETTI-JÚNIOR *et al.*, 2013; BEAUCHAMP *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014; SHARPLES, STEWART and SEABORNE, 2016). Sendo assim, o conhecimento das vias de sinalização moleculares que controlam o fenótipo muscular é de extrema relevância para o entendimento das adaptações que ocorrem neste tecido frente a diferentes estímulos, como a nutrição e o exercício físico, fatores que estão diretamente relacionados com a qualidade de vida da população.

1.2.1 Restrição Proteica Materna

Problemas de saúde pública envolvendo a escassez alimentar, como a desnutrição, ingestão insuficiente nutricional ou calórica e a fome, são mundialmente e perturbadoramente crescentes. Segundo o relatório “O estado da segurança alimentar e nutrição no mundo” do ano de 2021, da UNICEF, aproximadamente 10% da população mundial sofreu desnutrição no ano de 2020, sendo cerca de 811 milhões de pessoas em estado de subalimentação, a grande maioria foram mulheres, muitas anêmicas em idade reprodutiva. O relatório também mostra as consequências dessa problemática em crianças, estimando que mais de 149 milhões menores de cinco anos apresentavam atraso de crescimento ou estatura abaixo para idade; mais de 45 milhões eram debilitadas ou muito magras e, aproximadamente 39 milhões estavam acima do peso (FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO, 2021).

A desnutrição é uma condição patológica de desequilíbrio nutricional devido à ingestão insuficiente de nutrientes específicos e/ou calorias, tendo efeitos fisiológicos diretos e duradouros quando em períodos importantes de formação e crescimento, como o período intrauterino (BEAUCHAMP and HARPER, 2016; PERTILLE *et al.*, 2016). Nesses estágios, alterações na fisiologia da prole ocorrem em resposta às variações ambientais desfavoráveis maternas, que levam a possíveis consequências na sua vida adulta, como problemas cardíacos e doenças metabólicas (FOWDEN, GIUSSANI and FORHEAD, 2006; GICQUEL, EL-OSTA and LE BOUC, 2008).

No final da década de 1980, David Baker *et al.* já estudavam a relação entre doenças crônicas na vida adulta com insultos sofridos durante o período intrauterino e pós-natal. Os estudos forneciam indícios das relações: má nutrição infantil, aumento da incidência de mortalidade neonatal e baixo peso ao nascer com o aumento de mortes por doenças cardíacas

na idade adulta (BARKER, OSMOND and LAW, 1989; BARKER *et al.*, 1989a, b). A vulnerabilidade da prole aos insultos maternos nos períodos de gestação e lactação foi relatada em estudos epidemiológicos envolvendo eventos históricos fatídicos, como a gripe espanhola (1918) e a fome holandesa (1944), fornecendo evidências sobre os efeitos fisiológicos de condições adversas durante o período perinatal na população adulta (CARPINELLO, DECHERNEY and HILL, 2018).

Desde então, hipóteses foram propostas para o entendimento desta problemática (BARKER, OSMOND and LAW, 1989; BARKER, 1990; LUCAS, 1991, HALES and BARKE, 1992) e, atualmente, o conceito “Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença” (DOHaD) compõe uma sociedade internacional envolvendo pesquisa e políticas públicas (WADHWA *et al.*, 2009; SCHULZ, 2010), que visam a disseminação do conhecimento afim de diminuir os efeitos deletérios dos insultos nos períodos de pré-concepção, gestação, lactação, infância e adolescência (Figura 4).

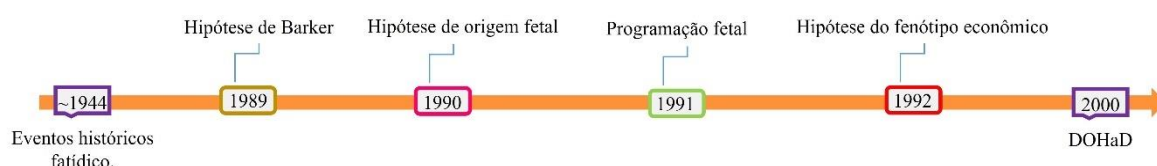


Figura 4. Resumo da linha do tempo das hipóteses propostas.

No tecido muscular, são documentadas algumas alterações resultantes da restrição nutricional materna, comumente as modificações morfológicas do tecido envolvem a morfologia (tamanho) e frequência dos tipos de fibras musculares e, molecularmente, a desregulação de genes de síntese, degradação proteica e miogênese (TOSCANO, MANHÃES-DE-CASTRO and CANON, 2008; CABEÇO *et al.*, 2012). Ruiz-Rosado *et al.* (2013), utilizando uma privação crônica alimentar (50% a menos de ingestão alimentar do grupo controle) durante toda a gestação e lactação, observaram um aumento na frequência das fibras do tipo IIA e IIX, e diminuição das fibras IIB no músculo EDL, de ratos aos 15 a 54 dias. Zhu *et al.* (2004) observaram uma diminuição da sinalização da expressão de genes relacionados a síntese proteica (mTOR), enquanto nenhuma diferença foi observada nas proteínas de degradação (ubiquitinação), em fetos bovinos cujas mães sofreram uma restrição calórica de 50% nos dias gestacionais 28 até 78.

Dado que os períodos de formação e desenvolvimento das fibras musculares são determinados respectivamente, durante a embriogênese e período pós-natal; da composição majoritariamente proteica deste tecido e da sua importância metabólica, a restrição específica de proteínas materna, em ambos os períodos de gestação e lactação, pode comprometer a

fisiologia muscular com consequências metabólicas na vida adulta (HOPPELER, 1986; ZHU *et al.*, 2006; BAAR, 2010). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que, durante a senilidade, o metabolismo glicolítico muscular é mantido no músculo EDL (característico deste metabolismo) em animais provenientes da restrição proteica materna (RPM) devido ao aumento do número de fibras do tipo IIB, além de promover a diminuição na expressão gênica da *Myog* e de genes relacionados com a matriz extracelular muscular (VALENTE *et al.*, 2021).

Embora seja consenso que a RPM promova alterações metabólicas sistêmicas, os estudos envolvendo o tecido muscular se concentram em alterações metabólicas pontuais, como em alvos regulatórios da glicólise e marcadores da oxidação de ácidos graxos. Pouco se sabe sobre as vias envolvidas com essas alterações, fazendo com que esse tema seja relevante para o entendimento sistêmico deste insulto, além do seu efeito no tecido muscular (ARAGÃO *et al.*, 2014; de BRITO ALVES *et al.*, 2017; MUROYA *et al.*, 2021).

1.2.2 Exercício Físico

Por ser um tratamento não farmacológico, podendo ser realizado de forma gratuita, e recomendado para diversas doenças crônicas, como diabetes, doenças cardíacas e auxílio na sarcopenia, a prática de exercício físico é um hábito poderoso e relevante à saúde (VECHETTI-JÚNIOR *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; CORVINO *et al.*, 2015).

Independente do tipo do exercício físico, é sabido seus benefícios quando realizado de forma adequada para diversos sistemas e doenças, incluindo a recente COVID-19 (JIMENO-ALMAZÁN *et al.*, 2021). Diversos estudos randomizados são realizados para a comprovação dessas melhorias em humanos, Caruso *et al.* (2015) pacientes com doença arterial coronariana, com 8 semanas de treinamento obtiveram uma melhora na variabilidade de batimentos cardíacos. Ho *et al.* (2012) observaram uma redução no peso corporal e no percentual de gordura e uma melhora na aptidão cardiorrespiratória em participantes obesos e com sobrepeso em um protocolo de 12 semanas de atividades físicas. Reddy *et al.* (2019) demonstraram que 3 semanas de exercício auxiliaram no controle glicêmico de pacientes com diabetes do tipo I.

Devido à alta adaptabilidade muscular, os benefícios musculares observados pela prática regular de exercício físico são vastos, e incluem modificações morfológicas, bioquímicas e moleculares, incluindo a promoção da flexibilidade metabólica muscular (THOMPSON, 2002). Diversos protocolos com diferentes tempos, intensidades e tipo de exercício, resultam em hipertrofia, atenuação na perda da massa muscular durante a sarcopenia, melhora na resistência a fadiga muscular, aumento do volume mitocondrial, entre outros benefícios musculares

(ERGEN *et al.*, 2005; KONOPKA and HARBER, 2014; QAISAR, BHASKARAN and REMMEN, 2016).

Alguns estudos propõem o exercício físico como forma de prevenção das alterações fisiológicas, resultantes das condições adversas maternas durante o período perinatal, com enfoque materno; porém pouco se sabe sobre os efeitos do exercício físico como forma de atenuação ou reversão, com ênfase na prole.

Fidalgo *et al.* (2012), utilizando o exercício físico como forma de prevenção dos efeitos da RPM, observaram que a prole restrita de genitoras treinadas (corrida em esteira) antes e durante a gestação, apresentavam índices de glicemia e colesterolemia normalizados aos 150 dias. Macedo *et al.* (2021) com enfoque na doença metabólica diabetes, demonstraram que genitoras diabéticas melhoraram o metabolismo glicêmico avaliado pelo teste oral de tolerância a glicose (TOTG), após natação do 7º ao 16º dia gestacional. Nesta mesma linha, Leandro *et al.* (2012) demonstraram o efeito morfológico do treinamento em esteira em ratos adultos submetidos a RPM gestacional e lactacional. Os autores observaram que o exercício físico atenuava a diminuição no número de fibras oxidativas no músculo SOL, porém nenhuma análise molecular foi realizada. Esses achados demonstraram que o exercício físico atua como um importante estímulo ambiental positivo para os efeitos nocivos das condições adversas maternas.

Apesar de bem estabelecido os efeitos benéficos do exercício físico na saúde de indivíduos de todas as idades, bem como forma de tratamento e prevenção a diversas comorbidades, faltam informações sobre os mecanismos de sinalização envolvidos com as adaptações do exercício físico no tecido muscular na prole adulta submetida à RPM, principalmente análises que proporcionam uma visão ampla das vias moleculares envolvidas, como a análise proteômica.

1.3 Análise Proteômica

Os estudos “ômicos” de sequenciamento em larga escala (RNAseq, MircoRNoma; Metaboloma, Proteoma, etc.), juntamente com as ferramentas de bioinformática, ganharam notoriedade nas últimas décadas (ASLAM *et al.*, 2017). São abordagens relevantes, tanto para o entendimento da evolução das espécies, quanto para área clínica, devido a possibilidade de análises integrativas de dados para melhor entendimento das diferentes adaptações fisiológicas e/ou patogênese de diversos tecidos e organismos (GALLAGHER *et al.*, 2016; VISKER, *et al.*, 2020).

No âmbito evolutivo, as abordagens são amplas. Fantinatti *et al.* (2021) utilizando microRNoma de três diferentes espécies de peixes (pacu, tambaqui e tambacu), possibilitaram o melhor entendimento da relação entre elas, bem como os mecanismos envolvidos no crescimento e manutenção do tecido muscular. Okomura *et al.* (2005) lançaram mão da análise proteômica para uma comparação mais profunda dos diferentes tipos musculares, e para Gallagher *et al.* (2016), as análises de redes “ômicas” auxiliaram no esclarecimento de alterações em diploidias botânicas. Enquanto no setor clínico, o questionamento envolve desde alterações genéticas a ambientais, Santos *et al.* (2020) demonstraram os efeitos cancerígenos da RPM no proteoma da próstata e para Valente *et al.* (2021) a técnica de RNASeq auxiliou no esclarecimento da desregulação do mRNA de genes relacionados a matriz extracelular e ao citoesqueleto muscular de animais senis e submetidos à RPM. Já Andrade *et al.* (2015) utilizaram o transcriptoma para melhor entender a influência de uma dieta *high-fat* no câncer de mama.

Uma importante diferença da análise do proteoma em relação a outras técnicas, como o RNAseq, é a detecção e quantificação da expressão de diversas proteínas funcionais simultaneamente, aumentando assim o conhecimento sob determinado tratamento ou patogenia, sendo uma vantagem a ser considerada na escolha na utilização desta técnica (ABREU *et al.*, 2009; VOGEL and MARCOTTE, 2012; ASLAM *et al.*, 2017). A utilização do espectrômetro de massas (MS) de alto rendimento, como na técnica de *Shotgun Untarget*, permite uma análise abrangente e comparações do proteoma de diversos tecidos em diferentes condições (YATES, RUSE and NAKORCHEVSKY, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Atualmente, a grande catalogação de proteínas musculares derivadas do proteoma, devido à grande aceitação dessa técnica para esse tecido, permite o aprimoramento no conhecimento da plasticidade muscular em resposta aos diferentes estímulos e condições (GELFI *et al.*, 2006; LIMA LEITE *et al.*, 2014). Isto torna esta técnica relevante para elucidar potenciais vias envolvidas com a RPM e se, quando induzidas pelo EFA, poderiam atenuar seus efeitos nocivos, além de serem importantes para o esclarecimento das adaptações fisiológicas envolvidas no tecido muscular esquelético envolvendo esses insultos isolados e associados.

Neste trabalho, avaliamos se o EFA atenua os efeitos musculares provenientes da RPM, em ratos adultos, modificando o padrão proteômico muscular, considerando tipos musculares com características fenotípicas distintas: lento e de metabolismo oxidativo (SOL) e, rápido e de metabolismo glicolítico (PL).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se o impacto da restrição proteica materna (RPM) e do conhecimento dos benefícios do exercício físico aeróbico (EFA) sobre os diferentes tecidos e tipos musculares, é relevante estudar as possíveis alterações no músculo esquelético de ratos provenientes da RPM e submetidos ao EFA na idade adulta, como uma estratégia preventiva precoce para reduzir os impactos da RPM nas gerações futuras, melhorando o desenvolvimento do indivíduo jovem, e não apenas durante a meia-idade.

Para isto, foram avaliados os seguintes aspectos:

1. A resposta de dois tipos musculares distintos: Sóleo (SOL), de metabolismo oxidativo e contração lenta, e Plantar (PL), de metabolismo glicolítico e contração rápida, em animais adultos submetidos a RPM e ao EFA;
2. As possíveis alterações no metabolismo da glicose, sanguínea e de armazenamento muscular, em animais adultos submetidos a RPM e ao EFA;
3. As possíveis alterações nos padrões morfométricos do tecido muscular em animais adultos submetidos a RPM e ao EFA;
4. A expressão gênica de marcadores metabólicos importantes na regulação da manutenção do fenótipo muscular saudável;
5. O perfil proteico do tecido muscular em animais adultos submetidos a RPM e ao EFA, visto que a expressão de proteínas está diretamente relacionada a manutenção adequada do fenótipo muscular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do exercício físico aeróbico nos diferentes tipos musculares esquelético (metabolismo oxidativo/contração lenta e glicolítico/contração rápida) de ratos adultos submetidos à restrição proteica materna nos períodos de gestação e lactação.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos adultos, nos músculos SOL caracterizado como postural, com predominância de fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo, e PL caracterizado como locomotor, com predominância de fibras de contração rápida e metabolismo glicolítico, as seguintes características:

1. Peso corporal em diferentes idades (dia pós-natal - DPN 0, 21 e 90) da prole submetida a RPM;
2. Parâmetros biométricos como peso corpóreo, gordura corporal total, comprimento naso-caudal e distância ano-genital da prole no DPN 150, nos diferentes grupos experimentais;
3. Análises bioquímicas de glicose sanguínea e do glicogênio muscular da prole no DPN 150, nos diferentes grupos experimentais;
4. Análise morfométrica através da Área de Secção Transversal (AST) das fibras musculares de cortes histológicos da prole no DPN 150, nos diferentes grupos experimentais;
6. Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real após Transcrição Reversa (RT-qPCR) de genes catabólicos (*Murf1* e *Mafox*), anabólicos (*Igf1*), e de metabolismo oxidativo (*Cs* e *Pgc1 α*) e glicolítico (*Ldha*) da prole no DPN 150, nos diferentes grupos experimentais;
7. Perfil proteômico com a análise dos termos ontológicos e vias moleculares enriquecidas pelas proteínas diferencialmente expressas (PDE) na prole no DPN 150, nos diferentes grupos experimentais.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* pesando de 250 a 300 g, machos (n=7) e fêmeas (n=14) na idade reprodutiva (aproximadamente 3 meses) fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Setor de Morfologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, em caixas de polipropileno, sendo um animal por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de temperatura mantida entre 22 e 25°C, umidade relativa próxima de 55%, luminosidade e fotoperíodo de 12 horas (período de luz 07:00-19:00h), sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*. A limpeza das caixas foi realizada duas vezes por semana e os dejetos foram descartados em sacos brancos de resíduos infectantes e destinados ao posto de coleta para incineração. Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos de maneira aleatória para reprodução. O experimento foi conduzido de acordo com o *Arrive Guideline* (KILKENNY *et al.*, 2010), os procedimentos experimentais seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (CEUA- 1131).

4.2 Restrição Proteica Materna (RPM)

Após o período de adaptação, foi realizado o acasalamento e após a constatação da prenhez através do esfregaço vaginal, as genitoras foram colocadas em gaiolas individuais e divididas de maneira aleatória para compor dois grupos experimentais: grupo genitora controle (n=7), no qual as genitoras receberam ração padrão para ratos contendo 17% de proteína durante toda a gestação e lactação, e grupo genitora restrito (n=7) em que as genitoras receberam ração hipoproteica contendo 6% de proteína durante toda a gestação e a lactação. A ração padrão para ratos foi fornecida pelo Instituto de Biociências de Botucatu/ UNESP e a ração hipoproteica foi obtida da empresa PragSoluções (Tabela 1). A ração hipoproteica utilizada no experimento é bem estabelecida em diversos estudos, sendo utilizada em outros experimentos realizados no laboratório (VALENTE *et al.*, 2021), e em outros laboratórios do Setor de Morfologia,

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu (RINALDI *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2018).

Tabela 1. Componentes da ração hipoproteica obtida da empresa PragSoluções

Ingredientes	Normoproteica (17% de proteína) g/kg	Hipoproteica (6% de proteína) g/kg
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou pH 102 (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de Colina ou Bitartarato de Colina	2,5	2,5

** para conhecer a composição detalhada do mix de sais e vitaminas, consultar Reeves, Nielsen and Fahey, 1993. A Dieta é elaborada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brasil).

Foram utilizados, para a fase experimental, 56 filhotes machos. Imediatamente após o nascimento foi padronizado o número de animais para 8 filhotes por genitora, na proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre que possível, de forma que não ocorressem alterações no cuidado da mãe com a prole.

Após o desmame (DPN 21) todos os animais foram alimentados com ração padrão (17% de proteína) e água filtrada *ad libitum*, e divididos em dois subgrupos que, ao completarem DPN 90 foram submetidos ao EFA, compondo os seguintes grupos experimentais (Figura 5):

- Grupo controle sedentário (CS, n=8): prole macho provenientes das genitoras alimentadas com ração padrão para ratos durante toda a gestação/lactação e não submetidos ao EFA;
- Grupo controle treinado (CT, n=8): prole macho provenientes das genitoras alimentadas com ração padrão para ratos durante toda a gestação/lactação e submetidos ao EFA;
- Grupo restrito sedentário (RS, n=8): prole macho submetidos a RPM e não submetidos ao EFA;
- Grupo restrito treinado (RT, n=8): prole macho submetidos a RPM e ao EFA.

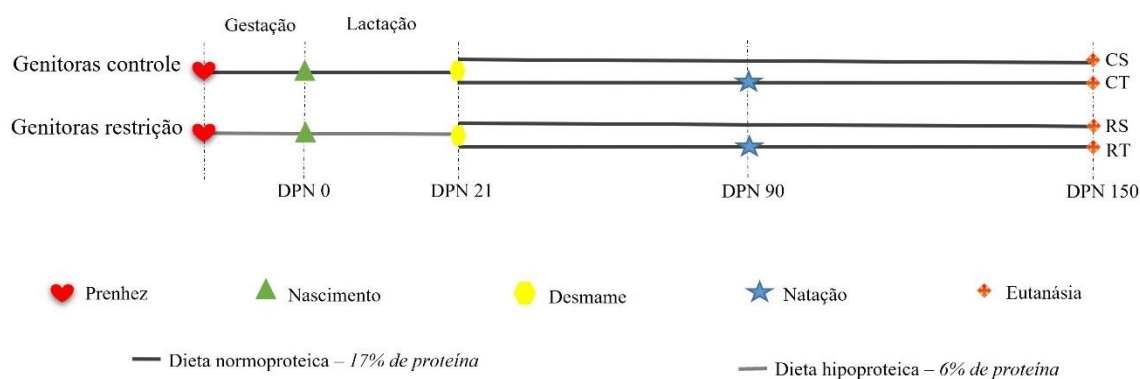


Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental utilizado. DPN: Dia pós-natal; CS: Controle sedentário; CT: Controle treinado; RS: Restrito sedentário e RT: Restrito treinado

Devido à dificuldade da obtenção da prole submetida a RPM e o alto grau de estresse das genitoras gerado pela restrição proteica, envolvendo perda da gestação e morte dos filhotes após o nascimento, foi necessário a utilização de muitas genitoras para obtenção do número adequado da prole restrita para a realização das técnicas.

4.3 Exercício Físico Aeróbico (EFA)

Aproximadamente, no DPN 80, todos os animais utilizados para o experimento foram transferidos para a Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu UNIPEX/FMB-UNESP, para a realização do protocolo de exercício físico aeróbico, no qual foram mantidos nas mesmas condições do Biotério de Pequenos Mamíferos do Setor de Morfologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu.

Todo o período de adaptação e treinamento foi realizado em sala aquecida e temperatura da água controlada entre 30°C e 32°C. Antes de iniciar o protocolo de EFA, todos os animais passaram por um período de adaptação que consistia em permanecerem em tanques contendo 10cm de água durante 10min por 5 dias, para a familiarização e adaptação com a água (Figura 6). Além disso, todos os animais foram manuseados igualmente, apenas por duas pessoas do grupo de pesquisa, independentemente de serem do grupo treinado ou sedentário, a fim de minimizar possíveis alterações nos resultados devido ao estresse do manuseio diário.

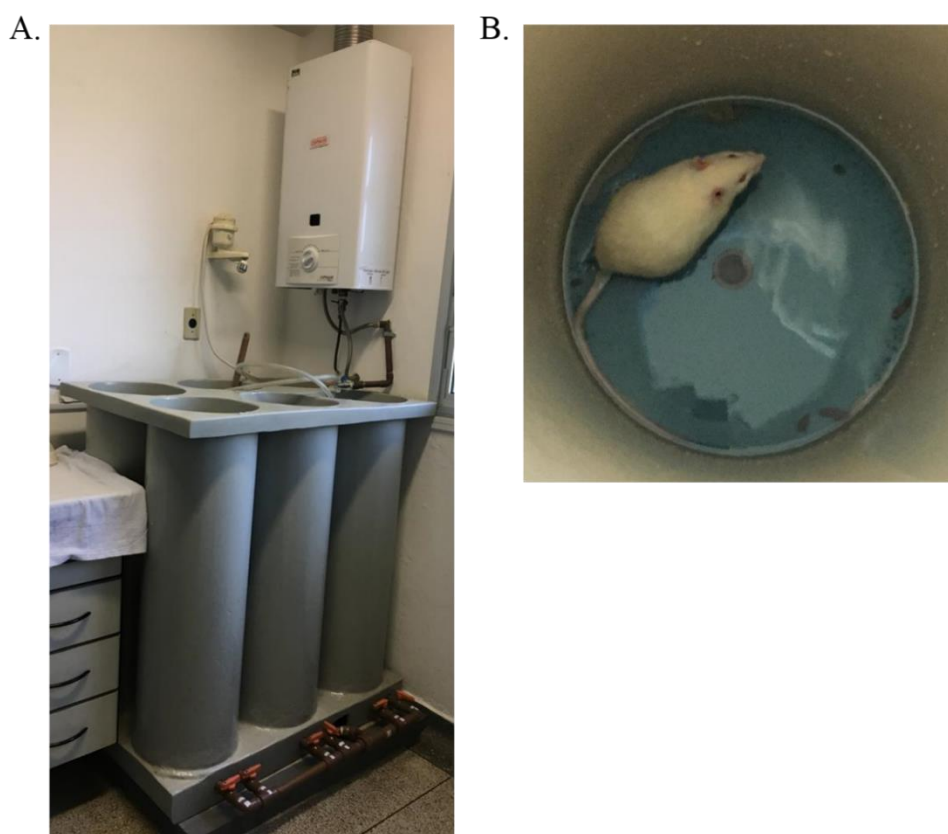


Figura 6. **A.** Tanque de treinamento dos animais. **B.** Adaptação dos animais.

Após o período de adaptação, os animais dos grupos CT e RT (animais que realizaram o EFA) foram submetidos ao protocolo de natação 5 vezes por semana (segunda a sexta-feira), durante 8 semanas, adaptado de VECNETTI-JÚNIOR *et al.* (2013). Os animais permaneceram em tanques contendo aproximadamente 80cm de água (suficiente para incentivá-los a nadar), o volume (tempo) e intensidade (sobrecarga) de treinamento foram progressivos, sendo equivalente a 10 min sem sobrecarga na 1ª sem; 20 min com carga equivalente a 1% do peso corporal (carga mínima) na 2ª sem; 30min com 1,5% do peso corporal (carga média) na 3ª sem; e 30min com 2% do peso corporal (carga máxima) a partir da 4ªsem (Figura 7A). Os animais foram pesados todas as segundas e quartas-feiras para manutenção do cálculo da porcentagem do peso corporal. As cargas consistiam em porcas e arruelas de diferentes tamanhos/pesos, e eram amarradas aos animais pela cauda por um elástico, de modo que não machucassem os animais (Figura 7B). As porcentagens das cargas para a determinação da intensidade foram estabelecidas para ambos os grupos (CT e RT), pelo limiar de lactato sanguíneo do grupo restrito submetidos a RPM, através da adaptação do teste de lactato (VOLTARELLI *et al.*, 2002) Os animais dos grupos CS e RS (animais que não realizaram o EFA) permaneceram em tanques semelhantes ao do período de adaptação, pelo mesmo tempo de treinamento dos grupos treinados, sem a adição da sobrecarga.

Após o protocolo de natação, todos os animais foram secos com toalhas e mantidos próximo ao aquecedor até retornarem ao biotério.



Figura 7. A. Esquema representativo do protocolo de treinamento dos animais. **B.** Pesos adicionados aos animais para a determinação da intensidade do exercício físico aeróbico.

No DPN 150, os animais foram pesados e receberam a morte humanitária por decapitação após anestesia. Amostras dos músculos SOL, de característica oxidativa e PL, de característica glicolítica, foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* a -80° até a realização da análises histológica, molecular e proteica. Ressaltamos que, foram utilizados os músculos de ambos os membros inferiores, esquerdo e direito, de todos os animais, permitindo assim a redução do número de animais para o experimento.

4.4 Teste de Limiar de Lactato Sanguíneo

Para definir uma intensidade ideal de treinamento aeróbico, foi realizado um teste de lactato para a obtenção do limiar de lactato ou limiar anaeróbico. Este teste determina o limiar pelo ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo, garantindo que o treinamento realizado é do tipo aeróbico quando mantido abaixo deste ponto (WASSERMA, 1964). Para isso foram realizados três testes, sempre aos sábados para que não interferisse nos dias de treinamento e os animais estivessem descansados. O primeiro teste foi realizado uma semana antes de iniciar

o protocolo de natação, o segundo teste no meio do protocolo de natação (ao completar 4 semanas de treinamento) e um último ao final do protocolo de natação, após a 8ª semana de treinamento.

Realizamos uma adaptação do teste de lactato realizado por Voltarelli *et al.*, (2002). Os testes consistiram em coletas de sangue na cauda dos animais, no seu estado basal (antes do teste) e ao final de cada série de natação, totalizando 5 séries com carga progressiva. Cada série teve duração de 3min e 30s por carga, sendo nos animais restritos a variação inicial de 2% e final de 6% do peso corporal de cada animal (2% - 1ª série, 3% - 2ª série, 4% - 3ª série, 5% - 4ª série e 6% - 5ª série), e nos animais controles, a variação foi de 3% a 7% do peso corporal de cada animal (3% - 1ª série, 4% - 2ª série, 5% - 3ª série, 6% - 4ª série e 7% - 5ª série). Caso algum animal não conseguisse atingir 2min e 30s do tempo de alguma série, o teste era encerrado. Em geral, os animais do grupo restrito finalizavam até a 3ª série, sendo o limiar deste grupo estabelecido como 2% do peso corporal, enquanto o limiar dos animais do grupo controle correspondeu a 3% do peso corporal (Figura 8). A determinação da intensidade do EFA foi então estabelecida para ambos os grupos treinados (CT e RT), pelo limiar de lactato sanguíneo do grupo restrito, sendo 2% do peso corporal, não havendo necessidade de alterá-lo durante o decorrer do protocolo de natação.

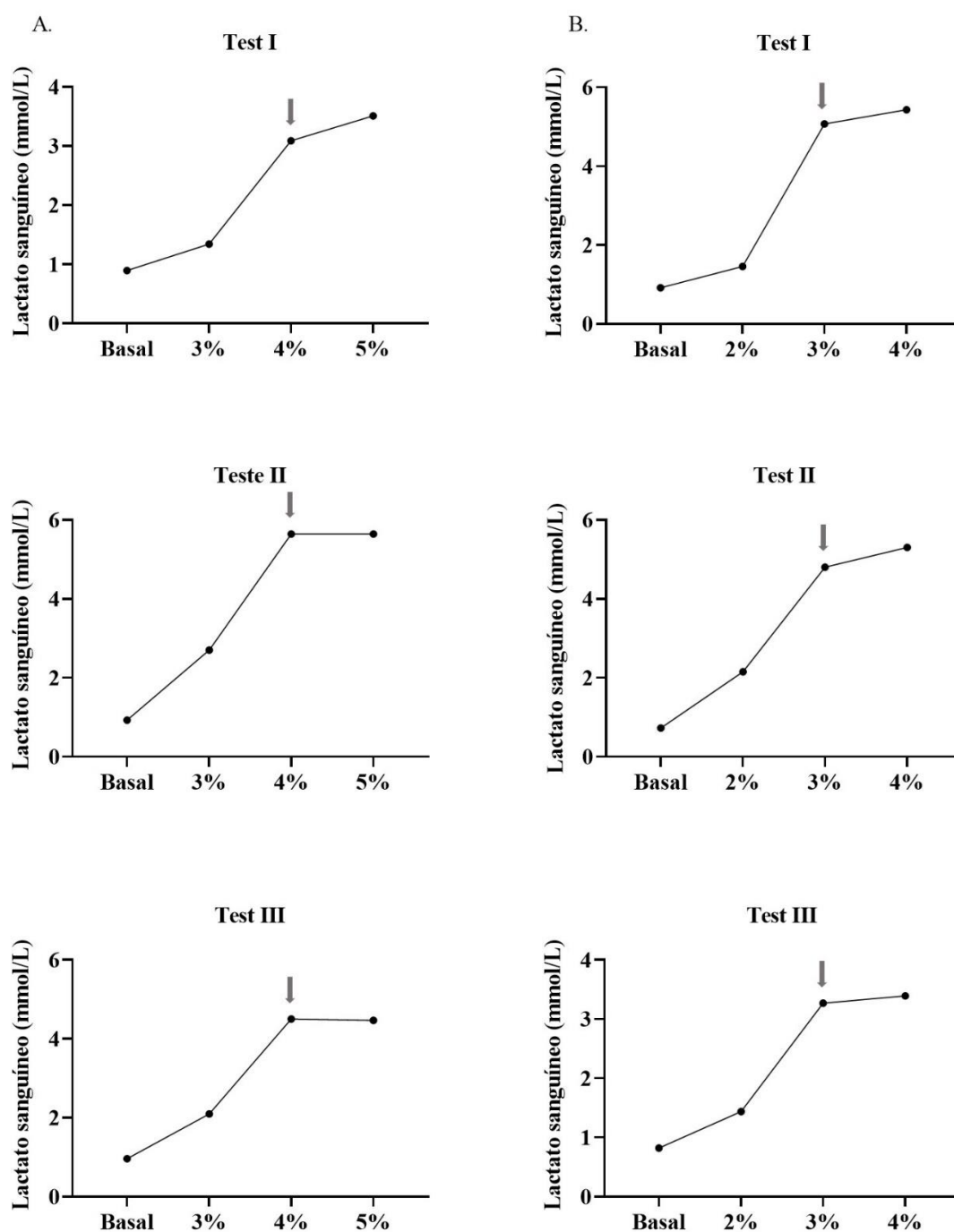


Figura 8. Gráficos representativos dos testes de Limiar de Lactato sanguíneo dos grupos treinados. **A.** Testes I, II e III de um animal do grupo controle. **B.** Testes I, II e III de um animal do grupo restrito. Setas indicam o ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo de cada grupo.

4.5 Parâmetros Biométricos

Durante todo o período do experimento foram monitorados o peso corporal das genitoras, bem como o consumo de ração.

O peso corporal da prole foi analisado no nascimento (DPN 0), DPN 21, 90, 120 e 150. Ao final do experimento, os parâmetros biométricos dos animais, como comprimento naso-caudal e distância ano-genital (DAG) foram mensuradas e a morte humanitária foi realizada. A gordura corporal total (estabelecida pela soma das gorduras retroperitoneal, epididimária e visceral) e os músculos SOL e PL foram coletados, pesados e submetidos ao processamento de congelamento por nitrogênio líquido para posterior análises histológica, molecular e proteica.

4.6 Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado no PND 150 conforme descrito por Corvino *et al.*, (2015). Os animais foram submetidos a jejum de 6 horas e os procedimentos foram realizados entre 16 e 18 horas. A solução de glicose (2g/kg de peso corporal) diluída em água foi administrada por gavagem oral (t=0 minutos), as amostras de sangue para medições glicêmicas foram obtidas da cauda, e foi utilizado glicosímetro de um toque para determinar níveis glicêmicos em t=0, 30, 60 e 120 minutos. As alterações da glicemia durante o TOTG foram avaliadas pelo cálculo da área sob a curva (AUC) e os valores também foram expressos em mg/dL.

4.7 Análises Morfológicas

Logo após a coleta, as amostras dos músculos SOL e PL foram cobertas com uma fina camada de *Tissue Tek Compound OCT* e, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para posterior análise morfológica e morfométrica ser realizada (n=8).

Cortes histológicos (10µm) foram obtidos em um criostato a -20°C, para a análise morfológica e mensuração da área de secção transversal (AST), foi realizada à coloração de Hematoxilina-Eosina (STEVEN and BANCROFT, 1990). Utilizando-se o Sistema de Análise de Imagens (*Leica Qwin*) foram feitas fotos no aumento de 20x de campos aleatórios por animal/músculo (~20 fotos), para a mensuração de aproximadamente 700 fibras, e a análise da AST foi realizada através do *software Image J* (SCHNEIDER *et al.*, 2012). A coloração de Ácido Periódico-Schiff (PAS) foi realizada para visualizar o padrão de deposição de glicogênio muscular (STEVEN and BANCROFT, 1990).

3.8 Análise Bioquímica – Glicogênio muscular

Aproximadamente 200mg dos músculos SOL e PL, foram digeridos em 2 ml de solução de KOH 30% em tubos Falcon e mantidos em banho Maria fervente por 1 hora. Em seguida, foi acrescentado 0,2 ml de Na₂SO₄, 6,0 ml de etanol, e levado ao banho Maria por cerca de 15 segundos. O material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C, e o precipitado ressuspenso em 2 ml de água destilada à 60°C, posteriormente, foram acrescentados novamente 6,0ml de etanol, o material foi agitado, aquecido em banho Maria e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. O precipitado foi diluído em 15 µl de solução fenol e 2 ml de ácido sulfúrico. Após diluição do precipitado o conteúdo de glicogênio foi levado ao banho fervente por 15 minutos e então foi quantificado por espectrofotometria a 490nm (RAFACHO *et al.*, 2008).

4.9 Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (BUSTIN *et al.*, 2009).

4.9.1 Extração de RNA com TRIzol (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA*)

Para a extração de RNA total, fragmentos dos músculos SOL e PL, previamente congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 ml de TRIzol/50-100 mg de tecido, conforme as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspenso em água ultrapura e armazenado a -80 °C. A quantificação do RNA foi verificada através do espectrofotômetro NanoVue Plus (GE HealthCare, EUA), e a integridade do RNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.9.2 Reação de Transcrição Reversa

Para a eliminação de possíveis resíduos contaminantes de DNA, o RNA total foi tratado com o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EUA), conforme especificação do fabricante, e posteriormente, a reação de Transcrição Reversa foi realizada pelo kit GoScriptTM Reverse

Transcription System (Promega, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizados 1 µg de RNA total obtido do músculo esquelético para a realização da técnica.

4.9.3 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *PowerSYBR®Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 6 µL do produto da reação da Transcrição Reversa, 7 µL de *Power SYBR®Green Mix*, e 2 µL dos *primers* “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) totalizando volume final de 15 µL de solução. Todos os *primers* dos genes analisados foram desenhados através do *software Primer Express®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no *GenBank* (www.pubmed.com) e sintetizados pela Exxtend Soluções em Oligos (Tabela 2). Para o músculo SOL foi utilizado o gene *PPIB* como endógeno, enquanto para o músculo PL, o gene *PPIA* foi a melhor escolha. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Quant Studio* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do *ct* comparativo (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001) utilizando o *Data Assist 2.0* (Life Technologies).

Tabela 2. Genes com *primers* desenhados a partir de sequências publicadas no *GenBank*

Sigla	Gene	Nº Acesso
<i>Ppia</i> *	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	NM_017101.1
<i>Ppib</i> *	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	NM_022536.2
<i>Mafox</i>	Atrogina 1	NM_133521.1
<i>Murf1</i>	Proteína ubiquitina ligase E3	NM_080903.1
<i>Igf1</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina 1	NM_001082477.1
<i>Cs</i>	Citrato Sintase	NM_130755.1
<i>Ldha</i>	Lactato desidrogenase A	NM_017025.2
<i>Pgc1α</i>	Coativador gama do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1α	NM_176075.3

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no *GenBank*. * *Genes Endógenos*

4.10 Análise do Proteoma

A análise global de expressão proteica (*Shotgun Untarget*) foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas, na Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP, utilizando uma adaptação do protocolo utilizado por Lobo *et al.* (2015).

4.10.1 Preparação das amostras para o Espectrômetro de Massas

As amostras individuais congeladas (~50mg) dos músculos SOL e PL (n=9 amostras de cada grupo e músculo) foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (IKA *UltraTurrax/T-25*) com 1mL de tampão de lise (7M ureia, 2M thiureia, 40mM dithiothreitol - DTT), seguido de 30min de centrifugação, a 1400 RPM à 4°C e coleta do sobrenadante contendo as proteínas solúveis. Na sequência, 25uL das proteínas de cada amostra compuseram *pools* padronizados para a concentração de 100ug/ml, e foram quantificadas pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976). Como cada *pool* continha três amostras por grupo/músculo, o número final de *pools* por grupo/músculo foi de três. Os *pools* foram incubados à 37°C por 30min, seguida da adição de DTT 100mM e novamente incubados por 40min à 37°C; em seguida, foi adicionado IAA 300 mM e as amostras permaneceram no escuro à temperatura ambiente por 30min. A digestão utilizada foi Tripsina durante 14h à 37°C, seguida por TFA5% à 37°C por 90min, 30min de centrifugação, 1400 RPM à 6°C, e o sobrenadante foi coletado para o início do protocolo colunar *Pierce C18 Spin*.

4.10.2 Protocolo Colunas *Pierce C18 Spin*

O processo colunar foi realizado seguindo as orientações do fabricante *Thermo Scientific Pierce™ C18 Spin Columns*. As colunas foram preparadas com as soluções de ativação (50%ACN) e equilíbrio e lavagem (0,5%TFA em 5%ACN). As amostras foram ligadas às colunas e as mesmas lavadas com a solução de equilíbrio e lavagem, e por fim as amostras foram eluídas das colunas pela solução de eluição (70%ACN e 0,1%Ac. Fórmico). As amostras foram submetidas a secagem e mantidas em -20°C até a passagem pelo equipamento Espectrômetro de Massas.

4.10.3 Espectrômetro de Massas

As amostras foram processadas pelo Espectrômetro de Massas em triplicata biológica (n=3) e técnica (cada amostra foi injetada 3x pelo equipamento). A identificação dos peptídeos foi realizada como descrita por Lima Leite *et al.* (2014), em um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA) acoplado a um espectrômetro de massa Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milford, MA). O sistema nanoACQUITY UPLC é equipado com uma *Trap Column* (responsável pela cromatografia; *Trap Column*: 100Å, 5 µm, 180 µm x 200 mm) previamente equilibrada com 99,9% de fase A (0,1% de ac. fórmico em água) a um fluxo de 5 µl/min e uma coluna HSS T3 M-Class (coluna analítica; coluna *Acquity UPLC HSS T3 M-Class* 75µm x150mm; 1,8µm) (Waters, Milford, MA), previamente equilibrada com 93% da fase móvel A e da fase móvel B (ac. fórmico a 0,1% em ACN). Os peptídeos foram separados por um gradiente linear de 7 a 85% da fase móvel B por 70 min com vazão de 0,35 µL/min; a temperatura da coluna foi mantida a 45 °C. O espectrômetro de massa Xevo G2 Q-TOF foi operado no modo de íon nano-eletro-spray positivo e os dados foram coletados usando o método MSE em energia elevada (19-45V). As condições ideais da fonte incluíram tensão capilar, 2,8kV; cone de amostra, 40V; cone de extração, 3.0V e temperatura da fonte 100 °C. A aquisição dos dados ocorreu por 70 min e o intervalo de varredura foi de 50 a 1.500 Da. O *lock spray* foi operado com uma solução de Glu-fibrinopeptídeo [Glu1] (1 pmol/µL) a uma taxa de fluxo de 0,3 µL/min, como um íon de referência no modo positivo a uma relação m/z 785,8427. O *software ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milford, MA) foi usado para processar e pesquisar os dados contínuos de LC-MSE. A identificação das proteínas dos músculos SOL e PL foi realizada usando o algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*, utilizando uma pesquisa no banco de dados do catálogo UniProtKB (*Universal Protein Resource*) (<http://www.uniprot.org>), para a espécie *Rattus norvegicus*. Os dados processados contendo as proteínas das comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS dos músculos SOL e PL serão disponibilizados após a publicação do artigo final, resultante desse estudo.

4.10.4 Obtenção das proteínas diferencialmente expressas (PDEs) analisadas

Para as filtragens iniciais foram excluídas as proteínas não identificadas, identificadas com apenas um peptídeo, que não faziam parte do organismo estudado (*Rattus norvegicus*), não revisadas e sem siglas para genes pelo *UniProtKB*. Estabelecemos $0.95 < p\text{valor} < 0.05$ como parâmetro para a obtenção das PDEs *up* e *down* reguladas, respectivamente. As proteínas listadas como únicas de um grupo/comparação foram consideradas *up* reguladas, sendo *down* reguladas na respectiva comparação. Para as análises foram consideradas as PDEs comuns entre

as comparações CTxCS para PDEs relacionadas com os efeitos do EFA, RSxCS para os efeitos da RPM, e RTxRS para os efeitos da RPM associada ao EFA.

As PDEs comuns entre as comparações foram analisadas através dos diagramas de Venn, gerados usando o *software FunRich* 3.1.3 (FONSEKA *et al.*, 2021). Os perfis de expressão das proteínas foram representados pelos *hetamaps* criados no *Microsoft Excel* considerando o pvalor das PDEs, no qual as proteínas listadas como únicas foram consideradas com maior valor para as proteínas *up* reguladas, ou menor valor para as proteínas *down* reguladas.

4.10.5 Obtenção dos termos ontológicos, vias moleculares enriquecidas e redes de interação das PDE comuns entre as três comparações

A obtenção dos termos enriquecidos e vias moleculares foi realizada através do *software Kobas* 3.0 (<http://bioinfo.org/kobas/genelist/>) (XIE *et al.*, 2011), identificados nos banco de dados *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <https://www.genome.jp/kegg/>), *PANTHER* (<http://pantherdb.org>), *Reactome* (<https://reactome.org/>). e considerados os processos biológicos no *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>). Foram selecionados os termos ontológicos e vias moleculares enriquecidas que obtiveram valor de $\text{padj} < 0.05$ e $-\log_{10}(\text{padj} < 0.05) \geq 1.5$. Posteriormente os termos ontológicos/vias moleculares foram classificados em processos importantes para o tecido muscular esquelético, semelhante ao estudo de Ubaida-Mohien, *et al.* (2019). As proteínas que não se encontravam nos termos selecionados obtidos pelo *Kobas* foram adicionadas de acordo com a função descrita no *UniprotKB*. Os gráficos de barras e pizza foram construídos usando o *software GraphPad Prism®* (versão 8.0.1, *Graph Pad, Inc.*, San Diego, CA). O diagrama de Alúvio conectando as proteínas alvo representativas em termos ontológicos/vias moleculares, foi gerado usando a ferramenta online *SankeyMATIC* 25 (<http://sankeymatic.com/>).

A análise de enriquecimento funcional das redes de interação proteína-proteína foi realizada utilizando a base de dados *String* (<https://string-db.org/>), utilizando como parâmetros para obtenção das redes: rede completa, evidência, mineração de texto, bancos de dados, experimentos e co-ocorrência, pontuação mínima de interação de alta confiança (0,700), e ocultação dos nós desconectados da rede para facilitar a análise de exibição.

4.11 Análise Estatística

Para os parâmetros maternos e da prole nos DPN 0 e 21, para amostras independentes e sem distribuição normal utilizou-se o teste Mann-Whitney. Para as amostras independentes e distribuição normal, utilizou-se o teste *T de Student* (NORMAN and STREENER, 2008). Para o peso corporal nos DPN 90 e 120, e dados no DPN 150, utilizou-se análise de variância para o modelo de medidas repetidas no esquema de 2 fatores (Anova *Two-Way*), quando independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (JOHNSON and WICHERN, 2007), quando randomizados complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (MONTGOMERY, 2012). Na ausência de distribuição normal utilizou-se o procedimento similar não-paramétrico complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009). Para todos os dados analisados, os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão (SEM) e o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

Os termos ontológicos e vias moleculares foram analisados pelas estatísticas estabelecidas pelo *software Kobas 3.0*.

5 RESULTADOS

5.1 Dados das genitoras

As genitoras submetidas à RPM consumiram menos ração durante o período de gestação e lactação, porém foi observada uma diminuição significativa no ganho do peso corporal das genitoras restritas somente no período de lactação. Não houve diferença estatística entre os números de filhotes total e, proporção entre fêmeas e machos entre os grupos de genitoras experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Dados avaliados para as genitoras durante a gestação e lactação

	Genitoras Controle	Genitoras Restrita
Consumo de ração gestacional (g)	515,10 ± 17,04	418,02 ± 20,17 **
Ganho de peso gestacional (g)	80,58 ± 7,57	74,02 ± 6,11
Consumo de ração lactacional (g)	1109 ± 58,59	373,65 ± 41,42 ***
Ganho de peso lactacional (g)	23,72 ± 7,49	-77,73 ± 6,87 ***
nº total de filhotes ao nascer	11 ± 1,26	12 ± 0,68
nº filhotes machos ao nascer	07 ± 1,23	06 ± 0,75
nº filhotes fêmeas ao nascer	05 ± 1,02	06 ± 1,3

Valores em média±SEM, Teste T de *Student* e *Many-Whitney*, **p<0,1 e ***p<0,001.

5.2 Dados da prole

5.2.1 Parâmetros Biométricos

No DPN 0, os animais do grupo restrito foram visivelmente menores e apresentaram menor peso e DAG, fato também observado no DPN 21 (Figura 9 e Tabela 4).

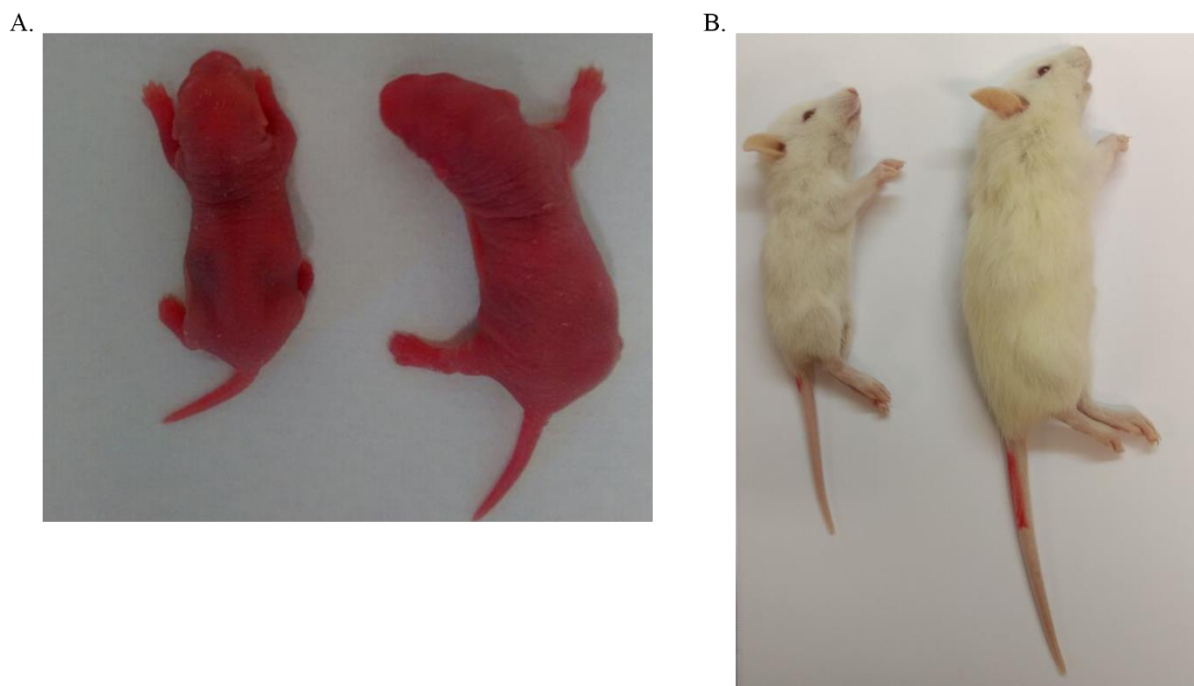


Figura 9. Imagem representativa dos grupos controle e restrito. À esquerda de cada foto, animal do grupo restrito e à direita, animal do grupo controle. **A.** Animais ao nascimento (DPN 0). **B.** Animais no DPN 21. DPN: dia pós-natal.

Tabela 4. Peso (g) e DAG (cm) dos animais controle e restrito, ao nascimento (DPN0) e no DPN 21

		Controle	Restrito
DPN 0	Peso (g)	7,35 ± 0,11	6,09 ± 0,12 ***
	DAG (cm)	3,15 ± 0,07	2,74 ± 0,07 *
DPN 21	Peso (g)	48,14 ± 1,04	20,03 ± 0,81 ***
	DAG (cm)	13,10 ± 0,60	7,75 ± 0,24***

Valores em média±SEM, Teste T de *Student*, * $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$. DPN: dia pós-natal. DAG: distância ano-genital.

Durante o protocolo de treinamento, os animais dos grupos CS e CT apresentaram maior peso que os animais dos grupos RS e RT. Ao final do protocolo de treinamento (DPN 150), os animais do grupo RT apresentaram o menor peso quando comparados aos animais RS. Os animais dos grupos CS e RT apresentaram um ganho de peso significativo apenas na primeira parte do protocolo de treinamento, e nos animais dos grupos CT e RS houve ganho de peso significativo durante todo o protocolo de treinamento (Tabela 5).

Tabela 5. Peso corporal dos grupos experimentais durante o protocolo de treinamento

	DPN 90	DPN 120	DPN 150
CS	396,85 ± 8,02 a	428,23 ± 8,25 b	441,69 ± 8,48 b
CT	400,08 ± 6,95 a	418,08 ± 5,49 b	438,77 ± 5,72 c
RS	307,46 ± 10,58 aβ	345,72 ± 11,61 bβ	361,09 ± 11,34 cβ
RT	300,83 ± 6,67 aμ	333,36 ± 11,61 bμ	339,60 ± 5,67 bμα

Valores em média±SEM, Anova *Two-Way* com Bonferroni. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais nos períodos de treinamento, α vs RS p<0,05; β vs CS p<0,05; μ vs CT p<0,05. Letras do alfabeto romano indicam diferença estatística entre os períodos de treinamento em um mesmo grupo experimental, a, b e c com p<0,001.

Os dados anatômicos dos grupos experimentais no DPN 150 estão descritos na Tabela 6. Não houve diferença entre os grupos experimentais na DAG e na distância naso-caudal. O peso do músculo SOL foi menor apenas no grupo RT quando comparado ao CT, e o peso do músculo PL foi menor no grupo RT comparado com o grupo RS. As gorduras epididimária, retroperitoneal, visceral e total tiveram o peso reduzido nos animais RS e RT, quando comparados aos CS e CT, respectivamente.

Tabela 6. Dados anatômicos dos animais dos grupos experimentais no DPN 150

	CS	CT	RS	RT
DAG (cm)	26,17 ± 0,93	23,93 ± 0,63	23,84 ± 0,66	25,72 ± 1,69
Distância naso-caudal (cm)	24,96 ± 0,18	24,57 ± 0,17	22,88 ± 0,49	22,03 ± 0,28
Peso músculo SOL (g)	0,169 ± 0,005	0,168 ± 0,009	0,145 ± 0,005	0,133 ± 0,005 μ
Peso músculo PL (g)	0,458 ± 0,02	0,423 ± 0,01	0,442 ± 0,03	0,361 ± 0,009 α
Gordura epididimária (g)	5,87 ± 0,36	4,99 ± 0,32	3,38 ± 0,38 ββ	3,63 ± 0,24 μ
Gordura retroperitoneal (g)	5,42 ± 0,52	4,19 ± 0,38	3,12 ± 0,51 ββ	2,22 ± 0,37 μμ
Gordura visceral (g)	4,68 ± 0,19	4,37 ± 0,23	3,87 ± 0,35 β	3,19 ± 0,28 μ
Gordura total (g)	15,97 ± 0,79	13,56 ± 0,89	10,72 ± 1,21 ββ	9,03 ± 0,83 μμ

Valores em média±SEM, Anova *Two-Way* com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; PL: Plantar; DPN: dia pós-natal; DAG: distância ano-genital. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS p<0,05 e ββ p<0,01; μ vs CT p<0,05 e μμ p<0,01; α vs RS p<0,05.

5.2.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

No teste oral de tolerância à glicose (TOTG) os animais dos grupos CS e CT apresentaram um padrão semelhante. Comparando os grupos RS e RT observou-se que houve

uma diferença estatística entre os grupos aos 60 minutos, onde no grupo RS os níveis glicêmicos sanguíneos se mantiveram elevados, conforme demonstrado tanto pela concentração de glicemia sanguínea quanto pelo AUC (Figura 10).

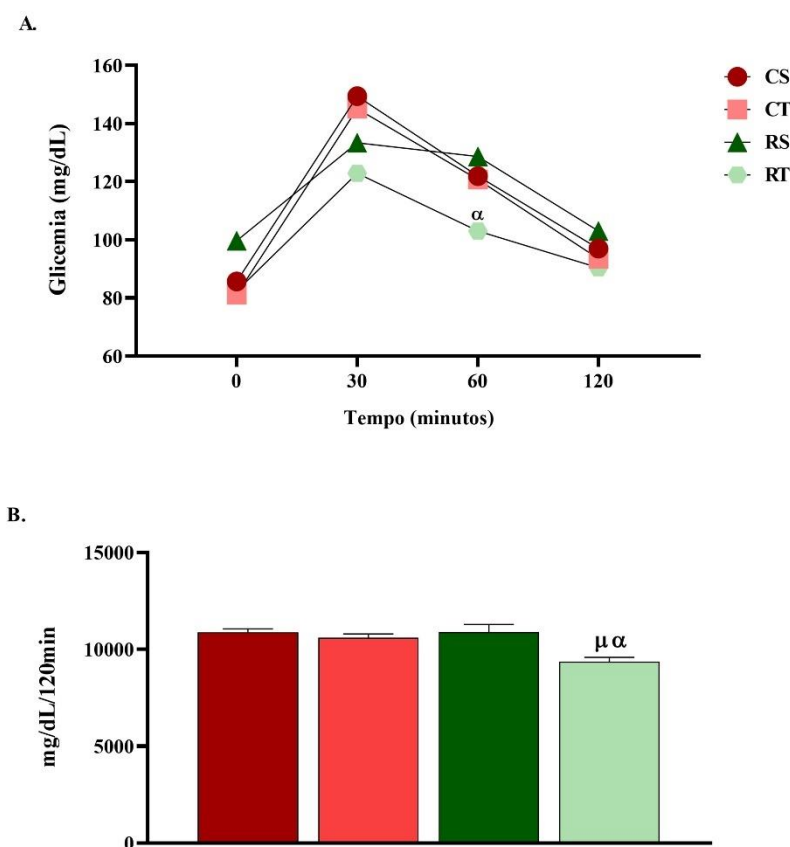


Figura 10. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. **A.** Glicemia (mg/dL). **B.** Área sob a curva (AUC). Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, μ vs CT $p < 0,05$ e α vs RS $p < 0,05$.

5.2.3 Análises Morfológicas e Bioquímica

5.2.3.1 Área de Secção Transversal (AST)

Os músculos SOL e PL apresentaram morfologia normal, com fibras musculares apresentando formato poligonal, multinucleadas e com núcleos periféricos (Figuras 11 e 12). A AST das fibras musculares de ambos os músculos aumentou nos animais do grupo RS e diminuiu significativamente quando esses animais foram submetidos ao EFA (grupo RT) (Figura 13).

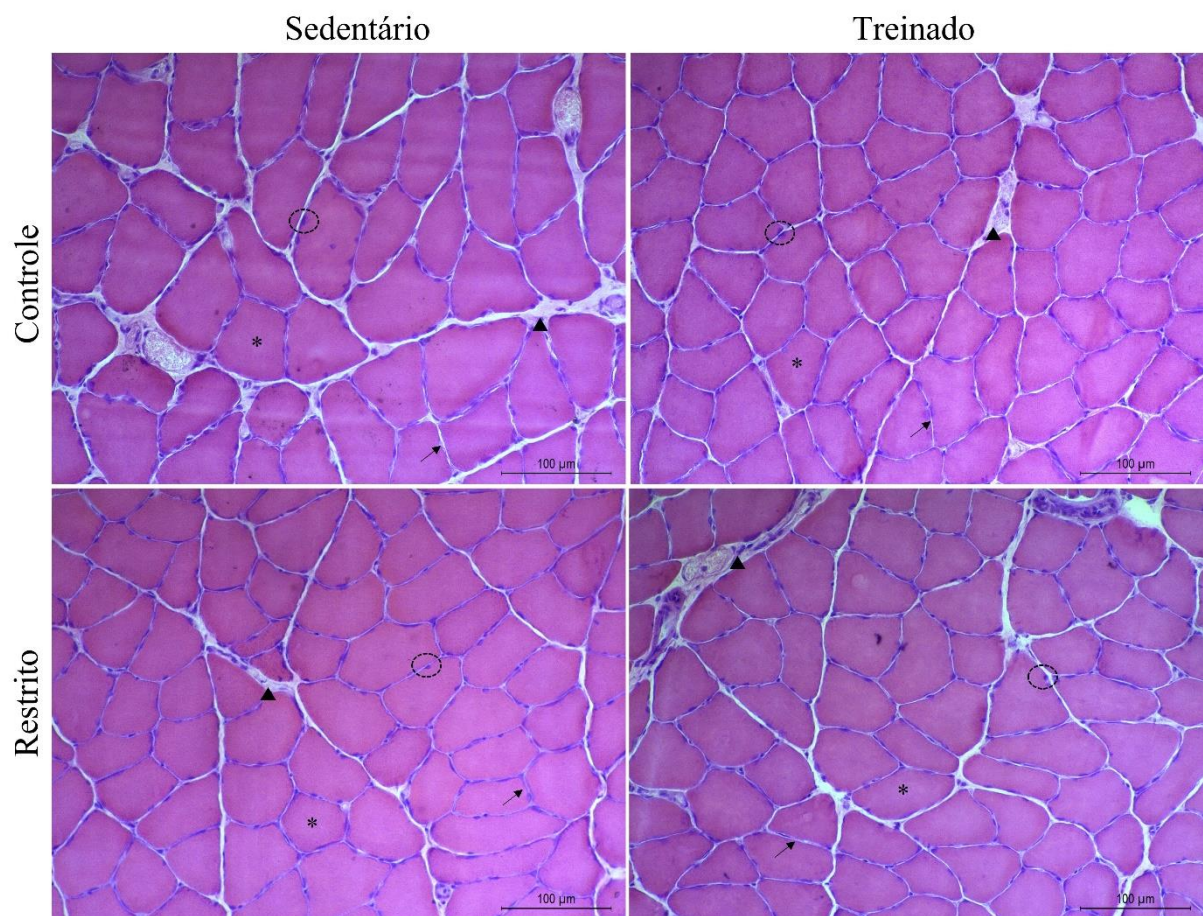


Figura 11. Corte transversal do músculo Sóleo (SOL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos circundados, endomísio (seta), perimísio (cabeça de seta). Escala: 100μm.

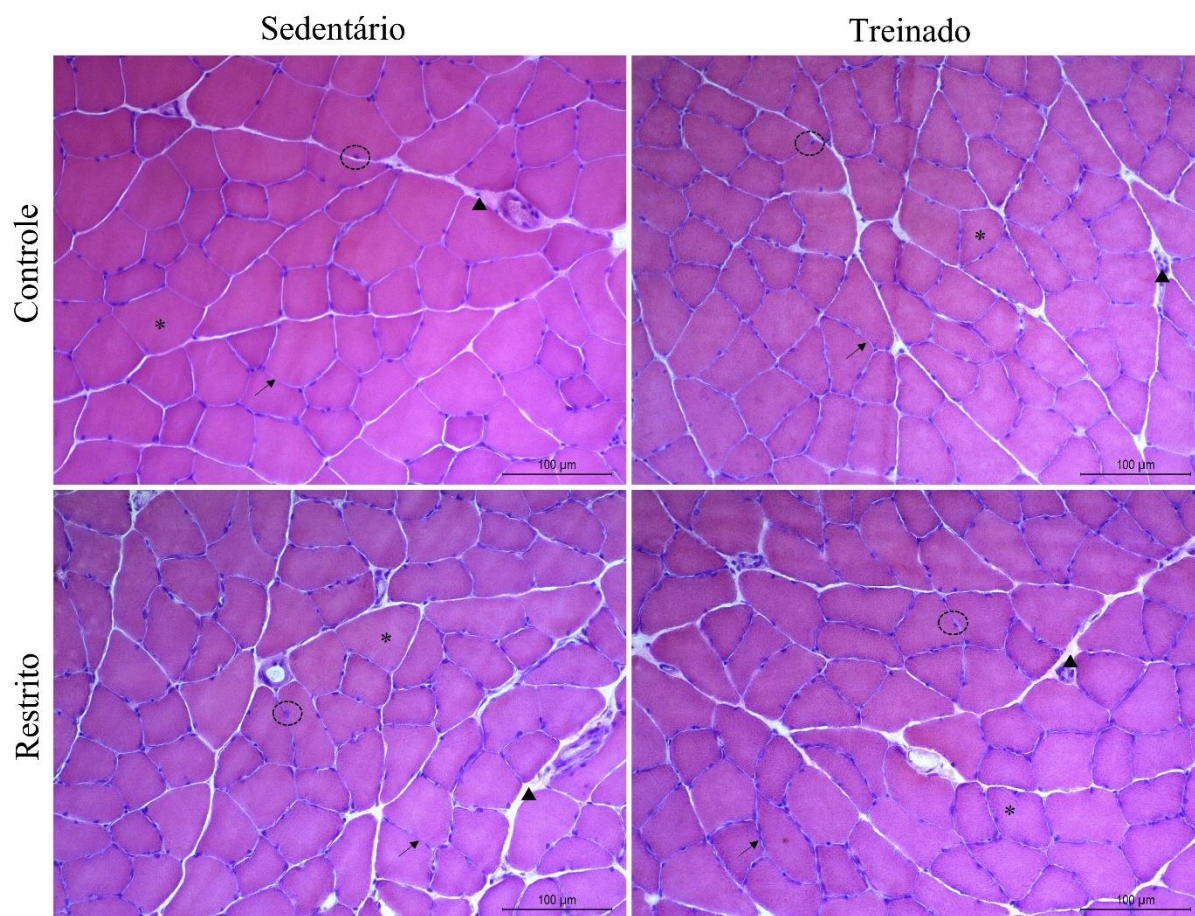


Figura 12. Corte transversal do músculo Plantar (PL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Hematoxilina e Eosina (HE). Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos circundados, endomísio (seta), perimísio (cabeça de seta). Escala: 100μm.

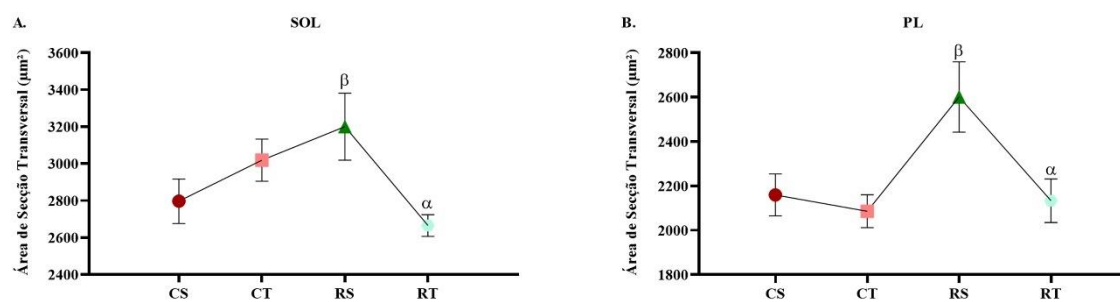


Figura 13. Área de Secção Transversal (AST) (μm²) das fibras musculares dos animais dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Músculo SOL. **B.** Músculo PL. Valores em média±SEM, Anova *Two-Way* com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; PL: plantar; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p < 0,05$ e α vs RS $p < 0,05$.

5.2.3.2 Deposição de Glicogênio muscular

A coloração PAS mostrou diferença na distribuição de glicogênio nas fibras musculares nos grupos experimentais, em ambos os músculos analisados (Figuras 14 e 15). A análise bioquímica demonstrou um aumento nos níveis de glicogênio nos animais do grupo RS, e uma

diminuição quando esses animais foram submetidos ao EFA (grupo RT), no músculo SOL (Figura 16).

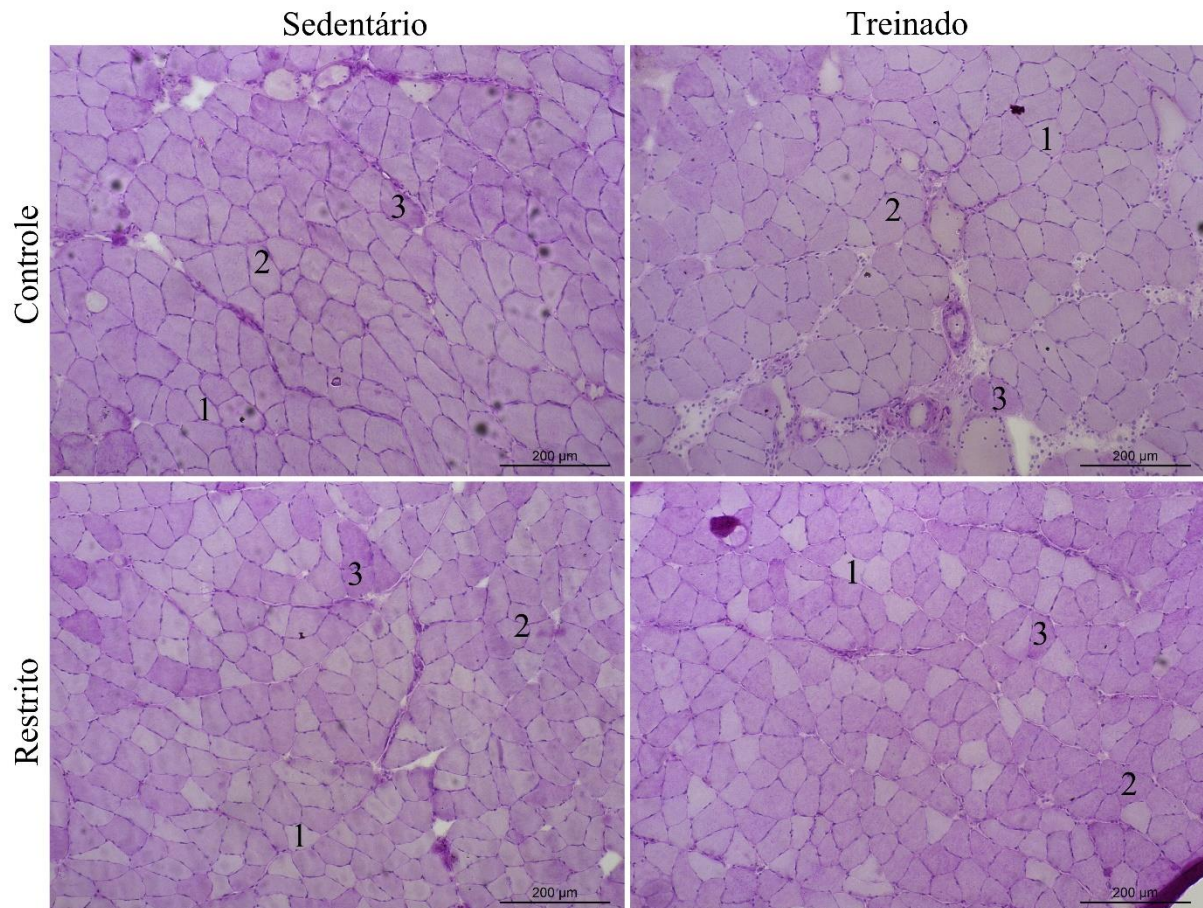


Figura 14. Corte transversal do músculo Sóleo (SOL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Ácido Periódico Schiff (PAS). Algarismos arábicos indicam a intensidade da deposição de glicogênio das fibras musculares, 3>2>1. Escala: 200µm.

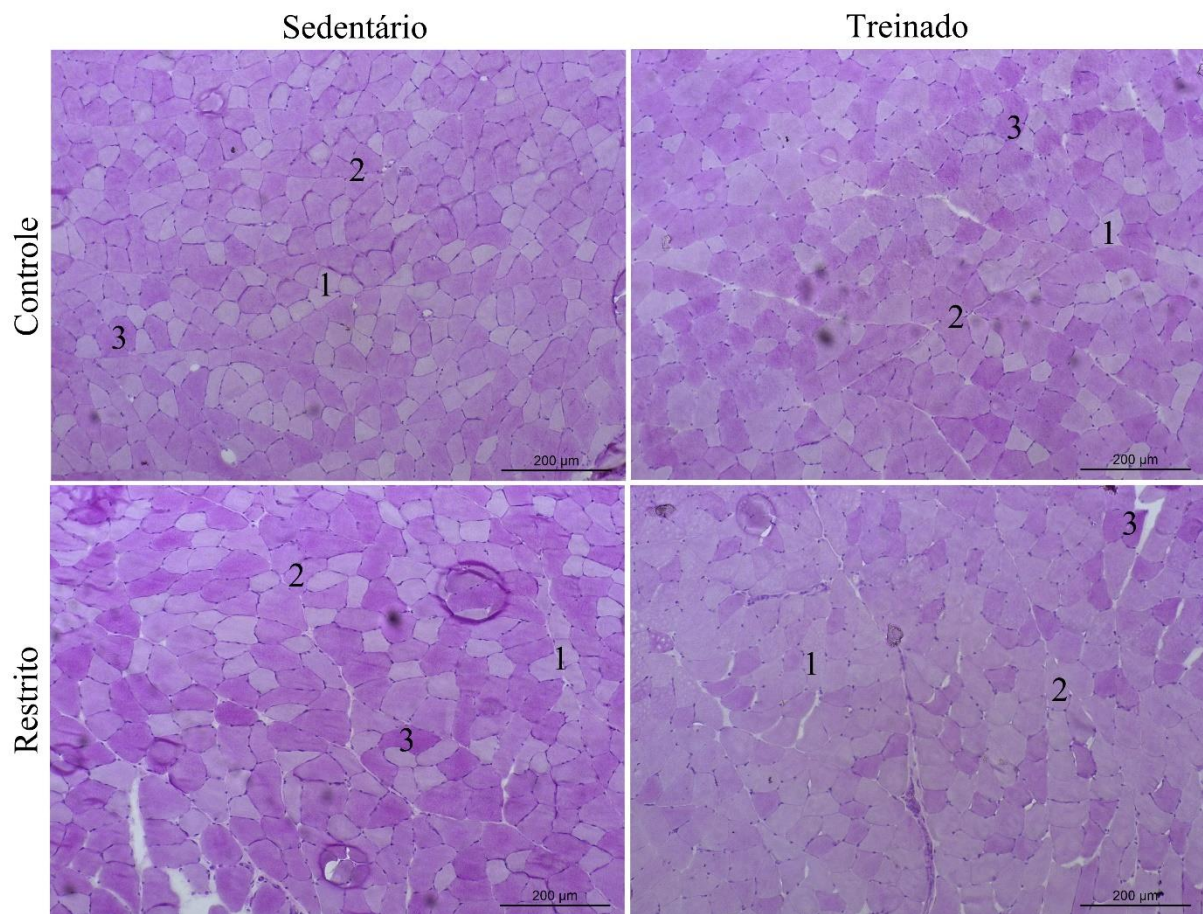


Figura 15. Corte transversal do músculo Plantar (PL) dos animais dos grupos experimentais no dia pós-natal (DPN) 150. Ácido Periódico Schiff (PAS). Algarismos arábicos indicam a intensidade da deposição de glicogênio das fibras musculares, 3>2>1. Escala: 200μm.

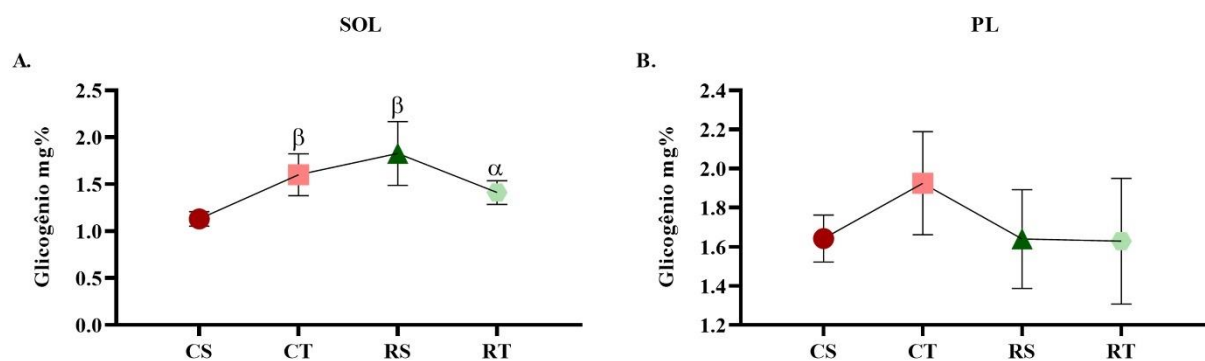


Figura 16. Níveis de glicogênio muscular (mg%) dos animais dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Músculo SOL. **B.** Músculo PL. Valores em média±SEM, Anova Two-Way com Tukey. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; PL: plantar; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p<0,05$ e α vs RS $p<0,05$.

5.2.4 Dados Moleculares: Expressão gênica

5.2.4.1 Músculo Sóleo (SOL)

Houve um aumento do marcador catabólico *Mafbx* no grupo RT comparado ao grupo RS, e uma diminuição na expressão de ambos os marcadores de catabolismo muscular (*Mafbx* e *Murf1*) no grupo RS comparado ao CS; houve uma diminuição na expressão gênica do marcador anabólico *Igf1* no grupo RT comparado ao grupo CT (Figura 17A). Observamos uma diminuição na expressão gênica dos marcadores de metabolismo oxidativo (*Cs*), e glicolítico (*Ldha*) nos grupos CT e RS comparados com o grupo CS (Figura 17B).

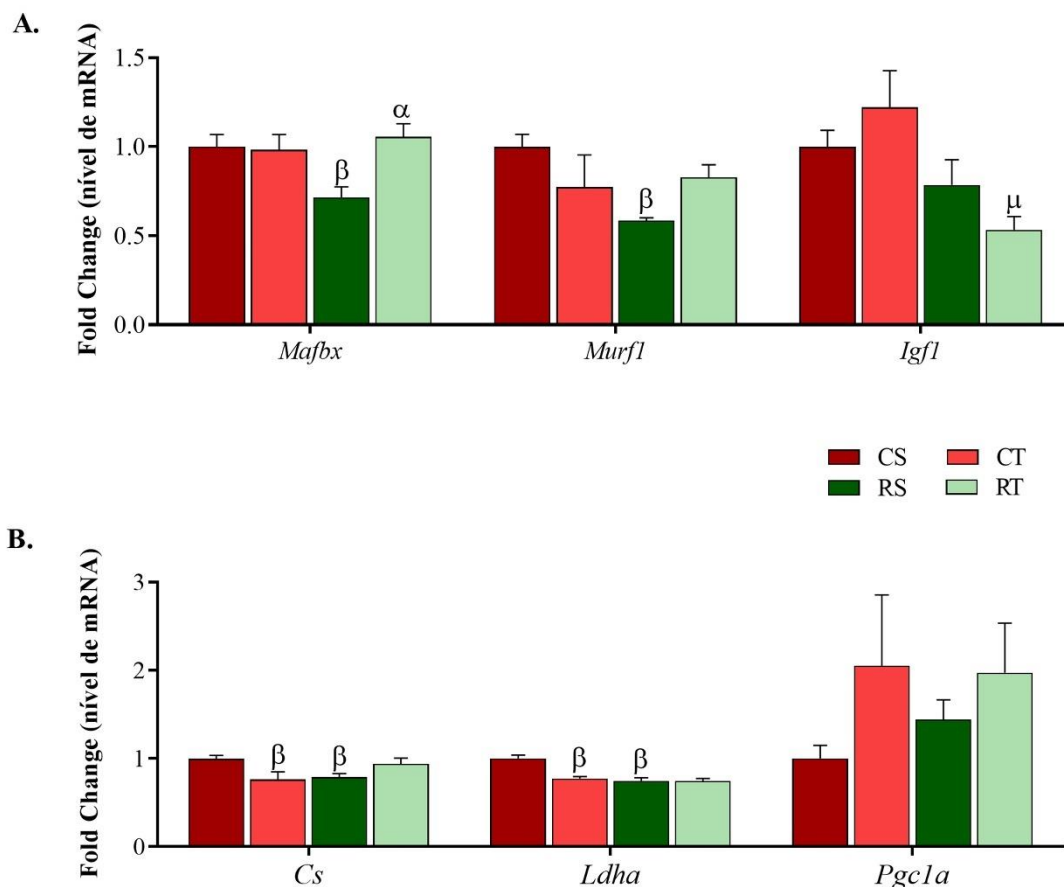


Figura 17. Níveis de Expressão gênica do músculo SOL dos grupos experimentais no DPN 150. **A.** Marcadores de catabolismo (*Mafbx* e *Murf1*), anabolismo (*Igf1*) muscular. **B.** Marcadores de metabolismo oxidativo (*Cs* e *Pgc1a*) e glicolítico (*Ldha*). Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey ou de Dunn. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; SOL: Sóleo; DPN: dia pós-natal. Letras do alfabeto grego indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, β vs CS $p < 0,05$; μ vs CT $p < 0,05$; α vs RS $p < 0,05$.

5.2.4.2 Músculo Plantar (PL)

O músculo PL não demonstrou alterações estatísticas significativas na expressão dos genes analisados (Figura 18).

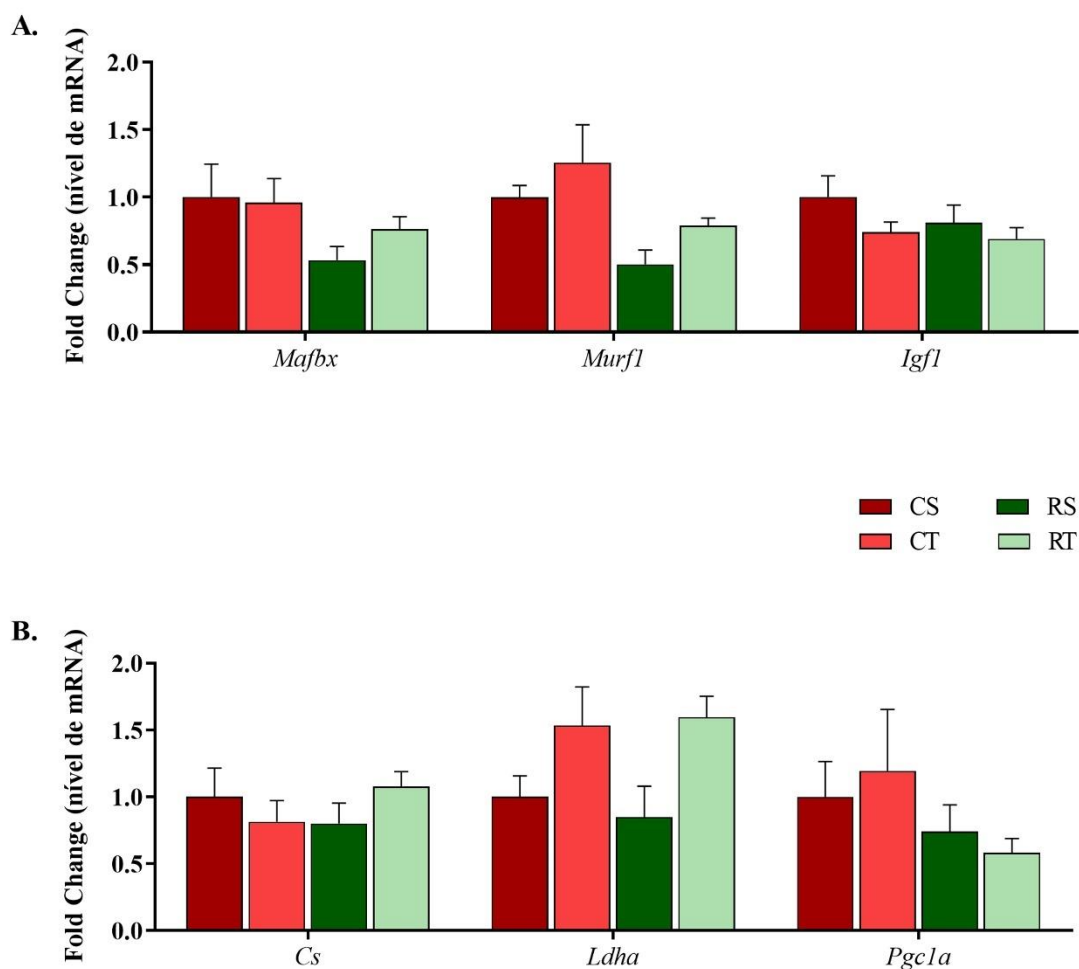


Figura 18. Níveis de Expressão gênica do músculo PL dos grupos experimentais aos DPN 150. **A.** Marcadores de catabolismo (*Mafbx* e *Murf1*) e anabolismo (*Igf1*) muscular. **B.** Marcadores de metabolismo oxidativo (*Cs* e *Pgc1a*) e glicolítico (*Ldha*). Valores em média $\pm$ SEM, Anova Two-Way com Tukey ou de Dunn. CS: controle sedentário; CT: controle treinado; RS: restrito sedentário; RT: restrito treinado; PL: plantar; DPN: dia pós-natal.

5.2.5 Dados moleculares – Proteômica

As etapas realizadas para a obtenção dos dados da proteômica dos músculos SOL e PL estão detalhadas na Figura 19. Após a limpeza e filtragem dos dados processados pelo Espectrômetro de Massas, foram identificadas 244 e 180 proteínas nos músculos SOL e PL (Anexos 1 e 2), respectivamente. Para investigar os efeitos da RPM associada ao EFA na prole macho adulta, utilizamos as seguintes comparações: CTxCS; RSxCS e RTxRS.

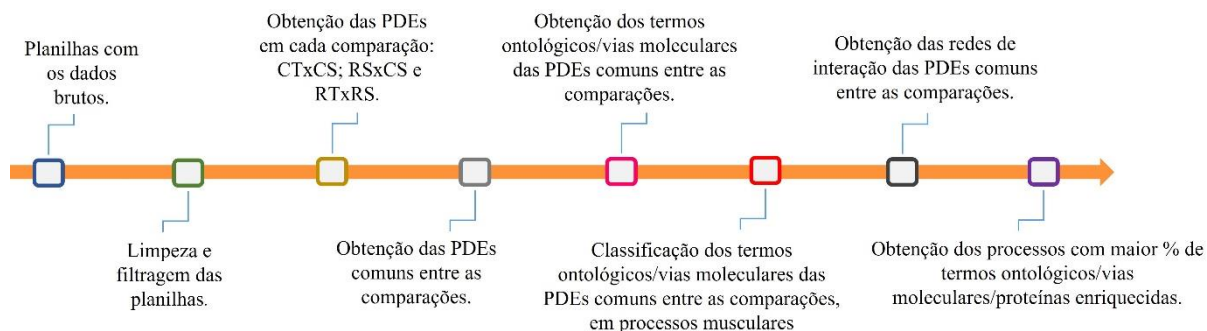


Figura 19. Linha do tempo contendo o passo a passo realizado com os dados proteômicos dos músculos Sóleo (SOL) e Plantar (PL).

5.2.5.1 Análise do Proteoma no Músculo SOL

As proteínas que apresentaram os parâmetros $0.95 < p\text{valor} < 0.05$ foram consideradas PDEs, com 126 proteínas resultantes da comparação CTxCS, 158 proteínas resultantes da comparação RSxCS, e 136 proteínas resultantes da comparação RTxRS e, 57 proteínas foram comuns entre as 3 comparações, conforme demonstrado pelo diagrama de Venn (Figura 20 e Tabela 7). Neste trabalho, seguimos analisando as proteínas comuns entre as 3 comparações.

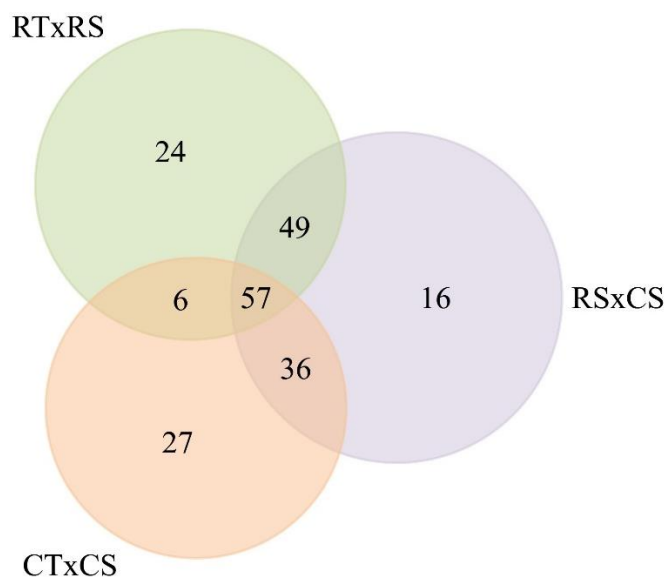


Figura 20. Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente expressas (PDEs) nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo SOL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo.

Tabela 7. Lista das 57 Proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS no músculo Sóleo (SOL)

Sigla	Proteína
ACADS	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial</i>
ACOX2	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2</i>
ACTA1	<i>Actin α skeletal muscle</i>
ACTA2	<i>Actin aortic smooth muscle</i>
ACTB	<i>Actin cytoplasmic 1</i>
ACTC1	<i>Actin α cardiac muscle 1</i>
ACTG1	<i>Actin cytoplasmic 2</i>
ACTG2	<i>Actin γ-enteric smooth muscle</i>
ALDOA	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>
ALDOC	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>
ANXA6	<i>Annexin A6</i>
ATP5F1A	<i>ATP synthase subunit α mitochondrial</i>
ATP5F1B	<i>ATP synthase subunit β mitochondrial</i>
CA3	<i>Carbonic anhydrase 3</i>
CCT5	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>
CKMT1	<i>Creatine kinase S-type mitochondrial</i>
CKMT2	<i>Creatine kinase U-type mitochondrial</i>
CRYAB	<i>Alpha-crystallin B chain</i>
CS	<i>Citrate synthase mitochondrial</i>
CYCS	<i>Cytochrome c_somatic</i>
DES	<i>Desmin</i>
ENO1	<i>α-enolase</i>
FMOD	<i>Fibromodulin</i>
HBA1	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>
HBB	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>
HSPA1B	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>
HSPA1L	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>
MB	<i>Myoglobin</i>
MDH2	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial</i>
MTCO2	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
MYH10	<i>Myosin-10</i>

MYH3	<i>Myosin-3</i>
MYH4	<i>Myosin-4</i>
MYH6	<i>Myosin-6</i>
MYH7	<i>Myosin-7</i>
MYH9	<i>Myosin-9</i>
MYL2	<i>Myosin regulatory light chain 2 ventricular/cardiac muscle isoform</i>
MYL6	<i>Myosin light polypeptide 6</i>
MYLPF	<i>Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform</i>
NDUFA10	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1a subcomplex subunit 10 mitochondrial</i>
NRAS	<i>GTPase NRas</i>
PDHB	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β mitochondrial</i>
PGAM2	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>
PYGM	<i>Glycogen phosphorylase muscle form</i>
SLC25A4	<i>ADP/ATP translocase 1</i>
SLC25A5	<i>ADP/ATP translocase 2</i>
TPI1	<i>Triosephosphate isomerase</i>
TPM1	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>
TPM3	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>
TPM4	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>
UQCRC1	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial</i>
YWHAB	<i>14-3-3 protein β/α</i>
YWHAE	<i>14-3-3 protein ϵ</i>
YWHAG	<i>14-3-3 protein ϵ</i>
YWHAH	<i>14-3-3 protein γ</i>
YWHAQ	<i>14-3-3 protein θ</i>
YWHAZ	<i>14-3-3 protein ζ/δ</i>

Considerando-se as 57 PDEs comuns entre as comparações, 152 termos ontológicos/vias moleculares foram enriquecidos pela ferramenta *Kobas*, e classificadas em processos importantes para o tecido muscular (Anexo 3) como, expressão gênica, sistema imune/processos inflamatórios, citoesqueleto, metabolismo em geral, enzimas quinases, estresse, processamento proteico, contração muscular, morte celular, ciclo celular, transporte, comunicação celular, sistema vascular, hormônios, e outros termos. Os principais processos

estavam relacionados com expressão gênica (16 proteínas), sistema imune/processos inflamatórios (11 proteínas), citoesqueleto (13 proteínas) e metabolismo em geral (19 proteínas), sendo este o processo composto pela maioria dos termos ontológicos/vias moleculares (15%) (Figura 21).

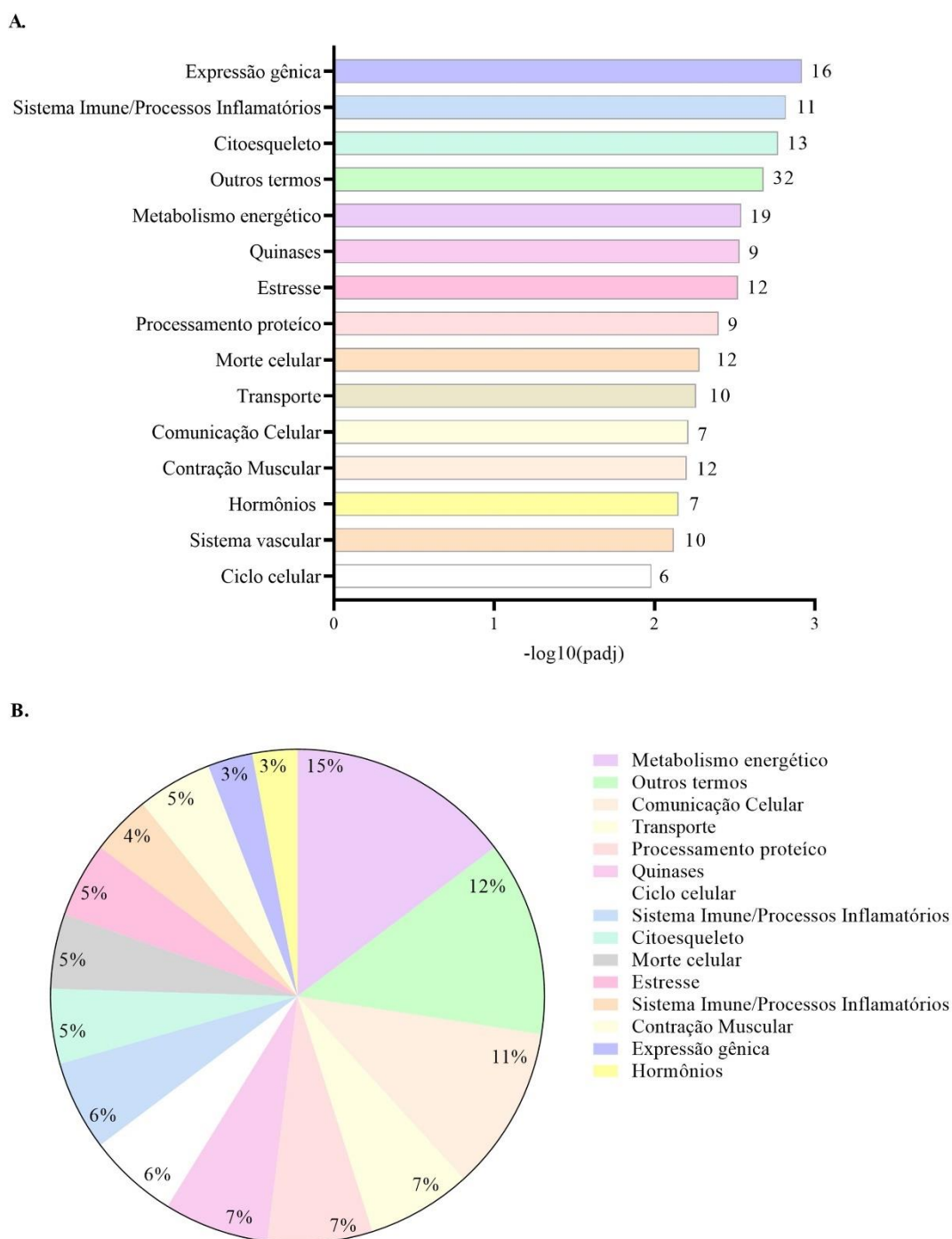
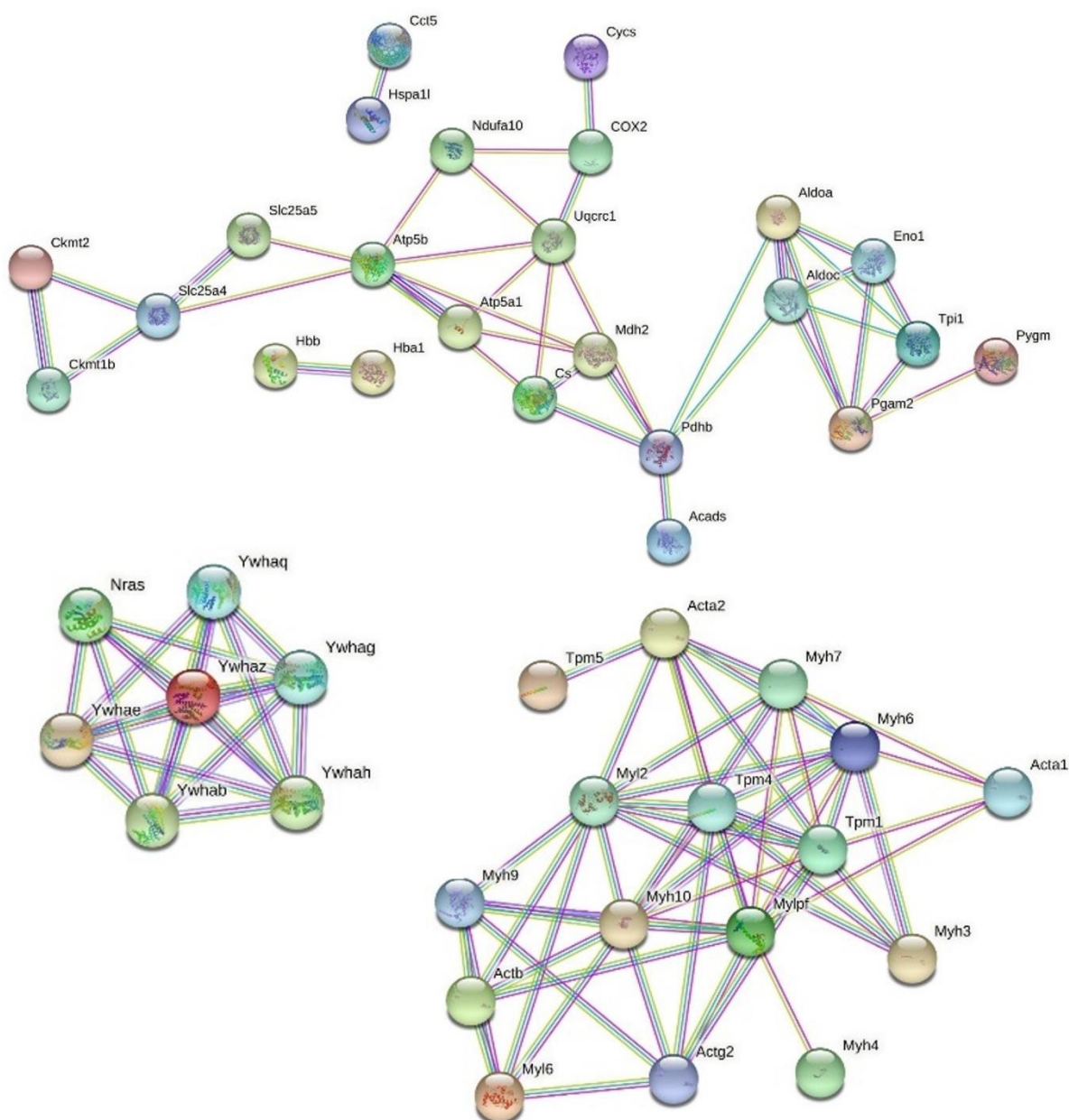


Figura 21. Termos ontológicos e vias moleculares enriquecidas pelas 57 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo SOL. **A.** Gráfico de barras demonstrando os processos musculares com os números de proteínas. **B.** Gráfico de pizza demonstrando a porcentagem dos termos ontológicos e vias moleculares em cada processo muscular. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado,

RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. Significativo quando valor de p corrigido < 0,05 e $-\log_{10}(p \text{ corrigido}) \geq 2.5$.

A análise das redes de interação proteína-proteína demonstrou três *clusters* principais, o maior deles, composto pelas proteínas que enriqueceram a classificação metabolismo em geral (ALDOA, ENO1, TPI1, PGAM, PYGM, PDHB, CS, ATP5A1, entre outras), seguindo-se o *cluster* formado por proteínas pertencentes aos termos relacionados com citoesqueleto e contração muscular (tropomiosinas, miosinas e actinas), e um *cluster* menor, composto pela família das proteínas YWHA (Figura 22).



sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas.

Considerando-se o processo do metabolismo em geral, que apresentou o maior número de proteínas envolvidas (19), os termos ontológicos/vias moleculares mais enriquecidos foram a via da respiração celular, composta pela glicólise, metabolismo do piruvato, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa ou cadeia respiratória, seguidos pela via da pentose fosfato, metabolismo de aminoácidos e β -oxidação de ácidos graxos (Figura 23A). O padrão de expressão dessas 19 proteínas está demonstrado no *heatmap* acoplado ao diagrama de Alúvio que mostra os termos ontológicos/vias moleculares em que as proteínas se encontram inseridas. O *heatmap* mostra um padrão de expressão diferenciado principalmente na comparação RTxRS, havendo um maior número de proteínas *up* reguladas (12 proteínas). Nos grupos CTxCS, 6 proteínas foram *up* reguladas e no grupo RSxCS, somente 4 proteínas foram *up* reguladas (Figura 23B).

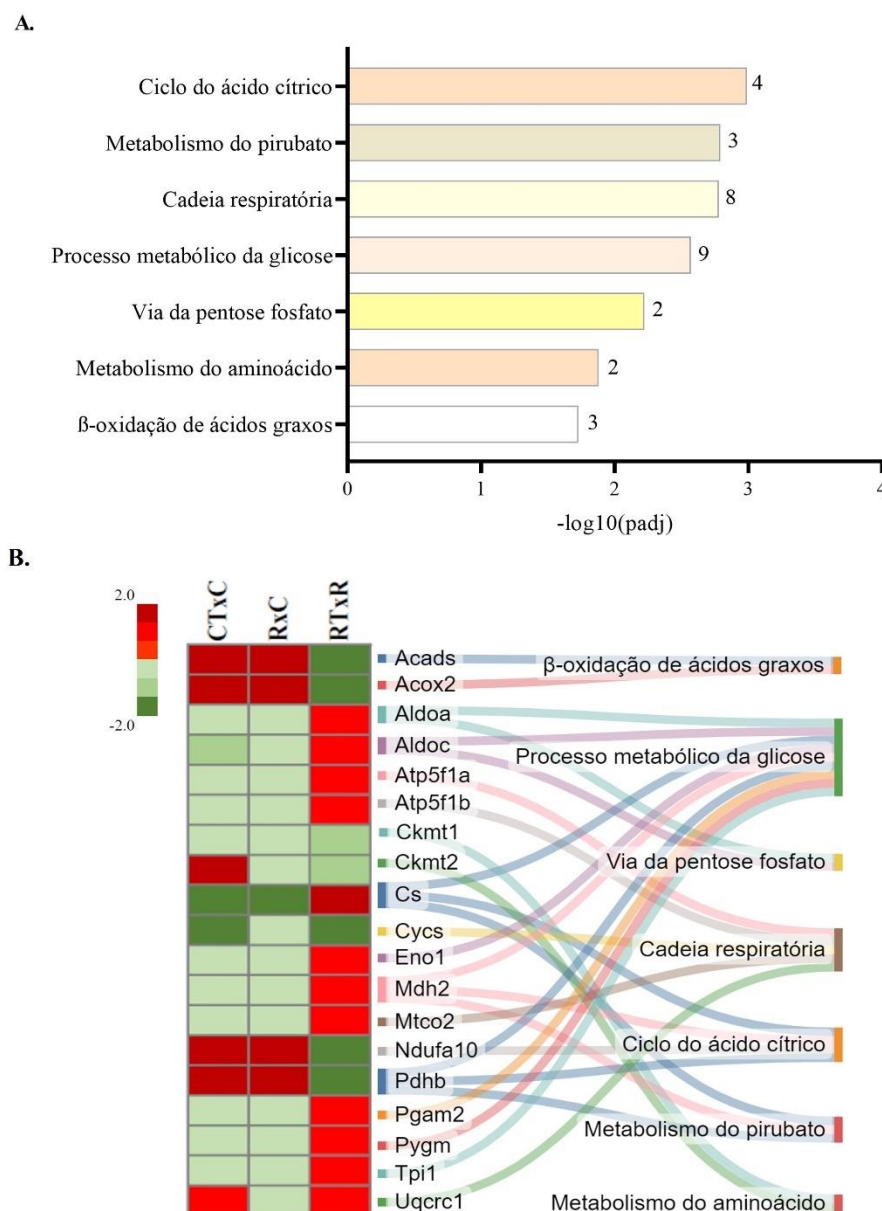


Figura 23. Termos ontológicos e vias moleculares do processo de metabolismo das 19 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo SOL. **A.** Gráfico de barras dos termos ontológicos/vias moleculares com os números de proteínas. **B.** *Heatmap* acoplado ao diagrama de alívio das 19 PDEs comuns entre as comparações e seus respectivos termos ontológicos/vias moleculares. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Sóleo.

A Figura 24 mostra detalhadamente a rede de interação entre as proteínas do processo de metabolismo em geral. O *cluster* menor é formado pelas proteínas envolvidas com o metabolismo do glicogênio (PYGM) e o processo de glicólise (PGAM2, ENO1, TPI1 e ALDOA), o *cluster* maior é composto pelas proteínas do metabolismo do piruvato (PDHB), ciclo do ácido cítrico (CS, MDH2 e NDUFA10) e cadeia respiratória (ATP5B, ATP5A1 e UQCRC1).

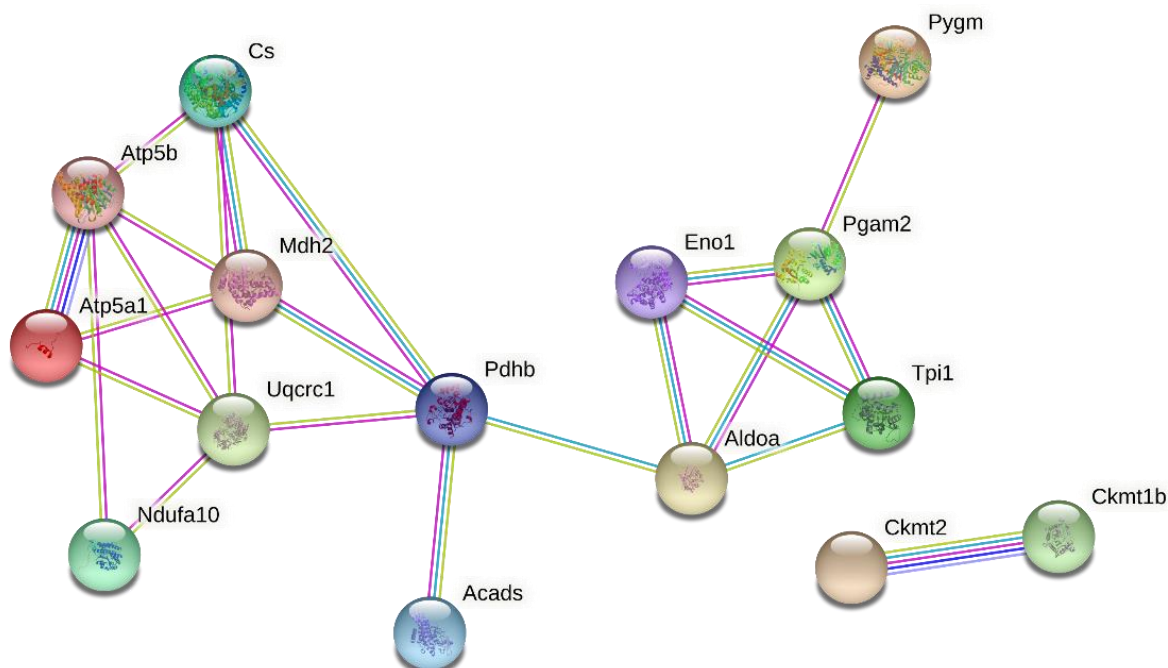


Figura 24. Rede de interação proteína-proteína das PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS envolvidas com o processo metabólico, no músculo SOL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, SOL: Soléio. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas.

5.2.5.2 Análise do Proteoma no Músculo PL

O músculo PL, assim como observado nas alterações moleculares, apresentou menos PDEs comparado ao músculo SOL. Obtivemos uma lista de PDEs contendo 106 para CTxCS, 83 para RSxCS, e 103 para RTxRS, e 33 PDEs foram comuns entre as 3 comparações, conforme demonstrado pelo diagrama de *Venn* (Figura 25 e Tabela 8), as quais foram consideradas para as análises seguintes.

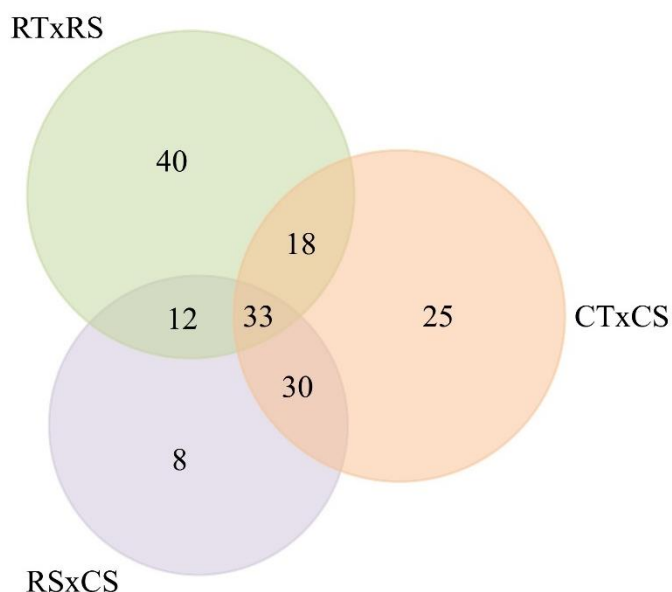


Figura 25. Diagrama de *Venn* com as proteínas diferencialmente expressas (PDEs) nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo PL. CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar.

Tabela 8. Lista das 33 proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS no músculo Plantar (PL)

Sigla	Proteína
ACOX2	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2</i>
ACTA1	<i>Actin α skeletal muscle</i>
ACTA2	<i>Actin aortic smooth muscle</i>
ACTB	<i>Actin cytoplasmic 1</i>
ACTC1	<i>Actin cytoplasmic 2</i>
ACTG2	<i>Actin γ-enteric smooth muscle</i>
ALDOA	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>
ALDOC	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>
ATP2A1	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>
ATP2A2	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>
ATP5F1B	<i>ATP synthase subunit β_ mitochondrial</i>
CA3	<i>Carbonic anhydrase 3</i>
DBI	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>
EEF1A2	<i>Elongation factor 1-α 2</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GAPDHS	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific</i>
H4C2	<i>Histone H4</i>

HBA1	<i>Hemoglobin subunit α-1/2</i>
LDHA	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>
MB	<i>Myoglobin</i>
MTCO2	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
MYH3	<i>Myosin-3</i>
MYH6	<i>Myosin-6</i>
MYH7	<i>Myosin-7</i>
PGAM2	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
PKM	<i>Pyruvate kinase PKM</i>
PYGM	<i>Glycogen phosphorylase muscle form</i>
SLC25A5	<i>ADP/ATP translocase 2</i>
TPI1	<i>Triosephosphate isomerase</i>
TPM3	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>
TPM4	<i>Tropomyosin α-4 chain</i>
TUBB4B	<i>Tubulin β-4B chain</i>

Considerando-se as 33 PDEs, 85 termos ontológicos/vias moleculares foram enriquecidos pela ferramenta *Kobas*, e classificados em processos importantes para o tecido muscular de acordo com a análise no *Kobas* (Anexo 4), resultando em: citoesqueleto, comunicação celular, contração muscular, estresse, hormônios, íons de Ca_2 , metabolismo em geral, morte celular, sistema imune/processos inflamatórios, transporte e outros termos. Os principais processos estavam relacionados com o sistema imune/processos inflamatórios (5 proteínas), contração muscular (6 proteínas), metabolismo em geral (14 proteínas) e processos envolvendo íons de Ca_2 (4 proteínas), sendo o processo de metabolismo em geral composto pela maioria dos termos ontológicos/vias moleculares enriquecidos, 22% (Figura 26).

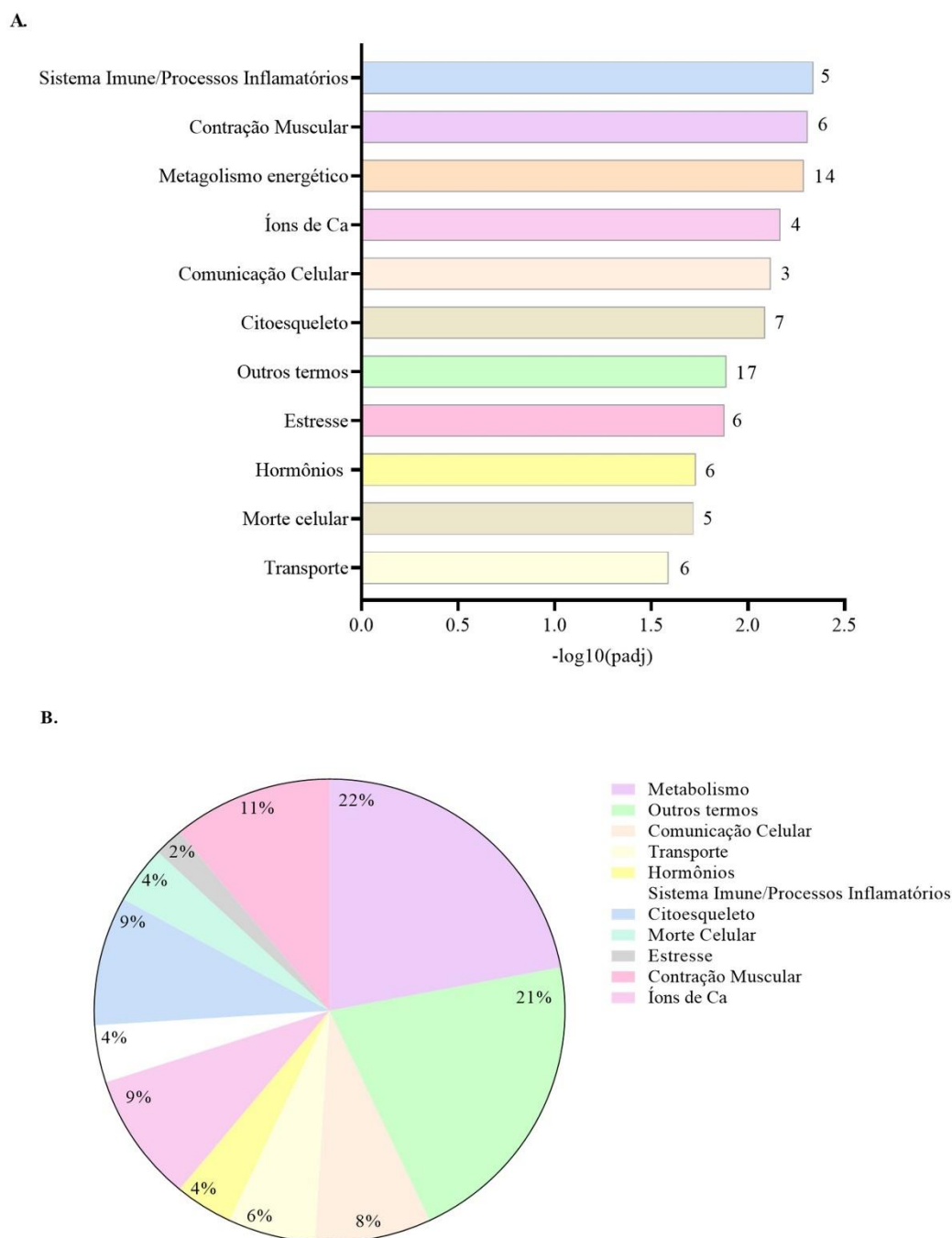


Figura 26. Termos ontológicos e vias moleculares das 33 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo PL. **A.** Gráfico de barras dos processos musculares com os números de proteínas. **B.** Gráfico de pizza demonstrando a porcentagem dos termos ontológicos e vias moleculares em cada processo muscular. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Significativo quando valor de p corrigido < 0,05 e $-\log_{10}(p \text{ corrigido}) \geq 2.5$.

A análise de redes de interação proteína-proteína demonstrou dois grandes *clusters* principais, o maior composto pelas proteínas que enriqueceram o processo do metabolismo em geral (ALDOA, ALDOC, LDHA, TPI1, PGAM, PYGM, entre outras), seguido pelo *cluster*

formado por proteínas pertencentes a classificação citoesqueleto e contração muscular (tropomiosinas, miosinas e actinas) (Figura 27).

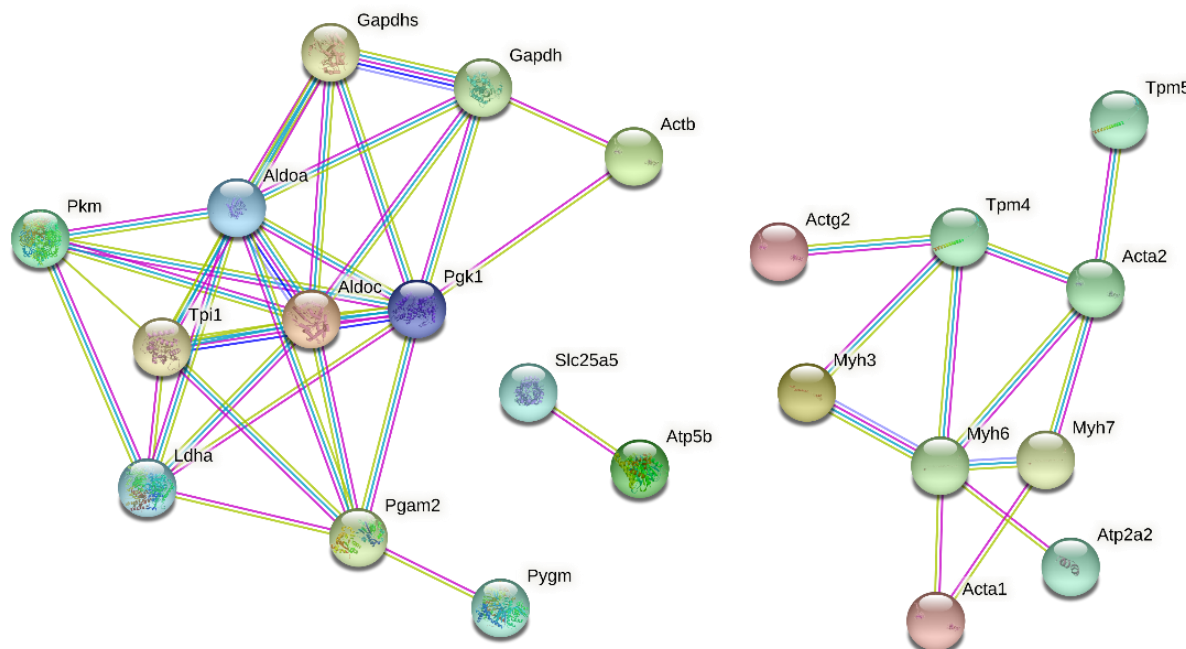
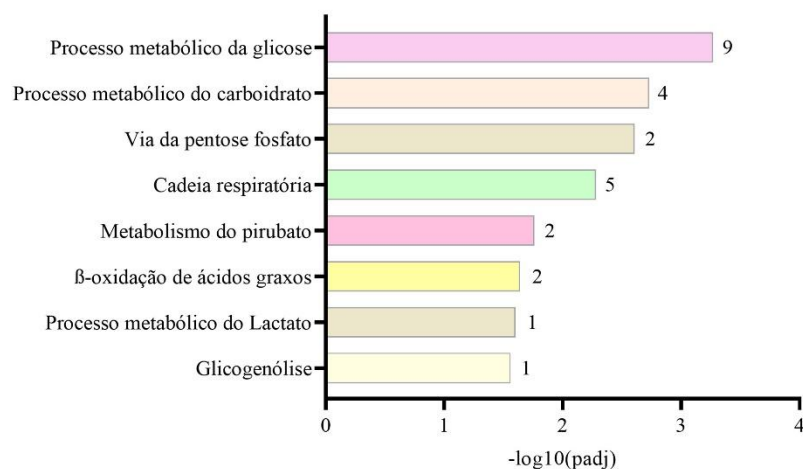


Figura 27. Redes de interação proteína-proteína das PDEs nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, no músculo PL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas.

Considerando-se o processo do metabolismo em geral, que apresentou o maior número de proteínas envolvidas (14), semelhante ao músculo SOL e com exceção do ciclo do ácido cítrico, os termos ontológicos/vias moleculares enriquecidas com maior significância foram os componentes da via da respiração celular, como glicólise, metabolismo do piruvato e fosforilação oxidativa ou cadeia respiratória, além do metabolismo de carboidratos, via da pentose fosfato, β -oxidação de ácidos graxos, metabolismo do lactato e catabolismo do glicogênio (Figura 28A). O padrão de expressão dessas 14 proteínas está demonstrado no *heatmap* acoplado ao diagrama de Alúvio que mostra os termos ontológicos/vias moleculares em que as proteínas se encontram inseridas. O *heatmap* mostra um padrão de expressão semelhante entre as comparações RSxCS e RTxRS, havendo poucas proteínas *down* reguladas, apenas 1 na comparação RTxRS e 2 proteínas na comparação RSxCS. No grupo CTxCS, apenas 2 proteínas apresentaram *up* reguladas (Figura 28B).

A.



B.

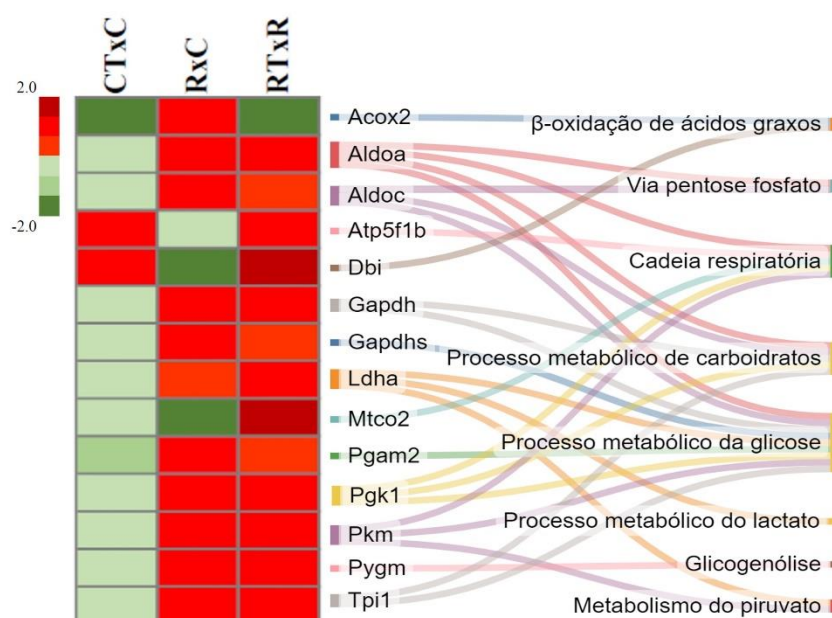


Figura 28. Termos ontológicos e vias moleculares do processo de metabolismo das 14 PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS, do músculo PL. **A.** Gráfico de barras dos termos ontológicos/vias moleculares com os números de proteínas. **B.** *Heatmap* acoplado ao diagrama de alívio das 14 PDEs comuns entre as comparações e seus respectivos termos ontológicos/vias moleculares. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar.

A Figura 29 mostra detalhadamente a rede de interação entre as proteínas do processo metabolismo no músculo PL, como um único *cluster* formado pelas proteínas envolvidas com metabolismo do glicogênio (PYGM) e o processo de glicólise (PKM, GAPDH, PGAM2, PGK1, TPI1 e ALDOA).

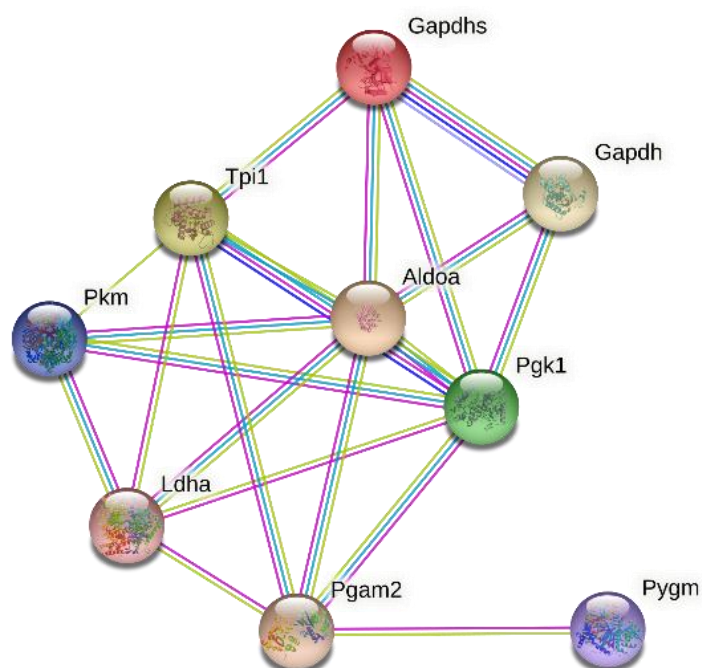


Figura 29. Rede de interação proteína-proteína das PDEs comuns nas comparações CTxCS, RxCS e RTxRS envolvidas com o processo de metabólico, no músculo PL. PDE: proteínas diferencialmente expressas, CS: controle sedentário, CT: controle treinado, RS: restrito sedentário, RT: restrito treinado, PL: Plantar. Linhas na cor azul claro: banco de dados, lilás: experimentos, amarelo: mineração de texto, azul escuro: co-ocorrência, cinza: proteínas homólogas.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico (EFA) em aspectos morfológicos e moleculares no músculo esquelético de ratos adultos submetidos à restrição proteica materna (RPM). Os principais achados confirmam a hipótese que o EFA atenua as alterações morfofisiológicas musculares provenientes da RPM, principalmente relacionadas ao metabolismo energético muscular, com efeito diferencial nos músculos, Sóleo (SOL), com metabolismo oxidativo/contração lenta, e Plantar (PL), com metabolismo glicolítico/contração rápida.

Como já demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, os animais provenientes da RPM nasceram menores e o peso corporal se manteve diminuído durante todo o protocolo experimental (CABEÇO *et al.*, 2012; VALENTE *et al.*, 2021). De Melo *et al.* (2011), utilizando a RPM (8%, gestação e lactação), observaram que o peso corporal da prole restrita se manteve menor do nascimento até o final do protocolo experimental (DPN 90). Confortim *et al.* (2015) relataram que aos 365 dias, os animais provenientes da RPM (6%, gestação e lactação), também apresentavam o peso corporal menor que os animais controles. Acreditamos que a diminuição do peso corporal dos animais submetidos à RPM, está relacionada ao menor consumo de ração das genitoras e ao grande estresse materno gerado pela falta de proteína alimentar durante a gestação e lactação. Esses dados, também confirmam os achados do nosso grupo de pesquisa em trabalho anteriormente realizado, demonstrando que a RPM interfere na manutenção do peso corporal durante as diferentes fases de desenvolvimento da prole, mesmo havendo a normalização da dieta após a gestação e lactação (VALENTE *et al.*, 2021).

Os animais submetidos a RPM (RS e RT), ainda que mantivessem seu peso e gordura corporal menores, apresentaram um ganho de peso significativo durante o período analisado, o que foi atenuado pela prática de EFA nesses animais (RT). Gutiérrez-Arzapalo *et al.* (2008), analisando os efeitos da restrição alimentar (50% a menos que a ingestão alimentar dos controles) na segunda metade da gestação, observaram que a prole restrita nascia com o peso corporal menor e após o DPN 21 já apresentava o peso corporal semelhante aos animais controles. Santos *et al.* (2018) estudando um modelo de RPM semelhante ao nosso (6%, gestação e lactação), observaram que a prole restrita apresentou um crescimento acelerado a partir do DPN 40, e entre o DPN 180-360 o peso corporal desses animais se igualava aos seus controles. O crescimento acelerado é comumente observado quando há restrição alimentar seguida de realimentação adequada, sendo frequentemente relatado em estudos relacionados à

programação fetal, no entanto, essa condição pode resultar em distúrbios envolvendo vários sistemas com o avançar da idade, além de diabetes do tipo 2, deposição lipídica e resistência à insulina muscular (CHO and SUH, 2016; SANTOS *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2020).

O crescimento acelerado também pode ser observado em órgãos não esqueléticos (GUTIÉRREZ-ARZAPALO *et al.*, 2008; FINKIELSTAINA, LUIB and BARONB, 2013). No nosso estudo, a RPM (RS) aumentou a AST das fibras musculares de ambos os músculos analisados (SOL e PL) no DPN 150, fato que foi atenuado pela prática do EFA no grupo RT, no qual a AST das fibras musculares foi semelhante ao do grupo CS. No músculo SOL, o aumento da AST no grupo RS foi acompanhado pela diminuição na expressão gênica dos marcadores catabólicos *Mafbx* e *Murf1*, e no grupo RT a diminuição da AST foi acompanhada pelo aumento na expressão gênica do *Mafbx* e diminuição do marcador anabólico *Igf1*. Levando em consideração que as fibras musculares de animais restritos no DPN 21 apresentaram um atraso em seu crescimento (dados não mostrados), acreditamos que o EFA auxiliou na contenção do processo de crescimento acelerado muscular, atenuando o efeito muscular observado nos animais submetidos a RPM no DPN 150.

Doenças metabólicas observadas na prole adulta, como diabetes do tipo 2 e resistência à insulina muscular, são distúrbios que podem ser derivados da programação fetal e do efeito de crescimento acelerado (VAAG *et al.*, 2006; JONES and OZANNE, 2009; SANDOVAL *et al.*, 2021). Xing *et al.* (2019) observaram que 40% da prole proveniente da RPM (8%, gestação) apresentaram efeito de crescimento acelerado, no qual a taxa fracionária de crescimento foi maior nesses animais aos 2 meses de idade, além de apresentarem níveis gênicos e proteicos reduzidos de GLUT4, sugerindo que o efeito de crescimento acelerado está associado a resistência à insulina muscular. Zeng *et al.* (2012) relataram alterações metabólicas na prole restrita e senil (RPM de 8%, gestação), demonstrando que a prole apresentou o efeito de crescimento acelerado a partir da 4ª semana, obesidade a partir da 12ª semana, além da expressão gênica diminuída do *Glut4* e *Pgc1α* no músculo gastrocnêmico.

Na análise do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) observamos indícios de alterações no metabolismo da glicose provenientes da RPM, que foi atenuado pela prática do EFA. A concentração de glicose sanguínea dos animais sedentários submetidos a RPM (RS) se manteve elevada durante todo o teste, enquanto nos animais submetidos ao EFA (RT), aos 60 min de teste, a concentração se encontrava reduzida e normalizada, aos 120 min. Os efeitos do EFA em animais obesos e diabéticos são bem definidos, Teixeira-de-Lemos *et al.* (2011) observaram uma redução na concentração de glicose sanguínea de ratos diabéticos adultos após 12 semanas de natação, enquanto Király *et al.* (2007) relataram que 13 semanas de natação

auxiliaram na manutenção da hiperinsulinemia e evitaram aumentos na glicemia em jejum em animais obesos e diabéticos. Macedo *et al.* (2021) analisando genitoras diabéticas, demonstraram que um programa de natação moderado durante a gestação reduziu os níveis glicêmicos durante o TOTG. É possível que a idade analisada no nosso estudo (DPN 90-150) envolva um período importante das alterações fisiológicas provenientes da programação fetal e do efeito de crescimento acelerado, em animais submetidos à RPM, e com o decorrer do tempo, estes poderiam desenvolver doenças metabólicas, como resistência à insulina, diabetes e obesidade. Assim, a prática regular de EFA nesse período, pode ser importante para a prevenção ou atenuação das alterações metabólicas no organismo, em animais submetidos à RPM.

Sendo o maior reservatório energético do corpo e o principal local de captação e armazenamento da glicose, insultos como a RPM e o EFA apresentam grandes efeitos sobre o tecido muscular (JENSEN *et al.*, 2011; HEARRIS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2021). No nosso estudo, a análise proteômica permitiu a avaliação dos termos ontológicos/vias moleculares e redes de interação proteína-proteína das PDEs comuns entre as comparações estabelecidas (CTxCS; RSxCS e RTxRS), nos músculos analisados (SOL e PL). O processo mais enriquecido, em ambos os músculos, foi o metabolismo energético muscular, composto por mais termos ontológicos e vias moleculares que os demais processos classificados, bem como pela maior quantidade de proteínas compondo os maiores *clusters* de redes de interação proteína-proteína. Merecem destaque as enzimas envolvidas com o metabolismo da glicose, e seu armazenamento, o glicogênio.

O tecido muscular pode utilizar diferentes fontes nutricionais para a obtenção de energia, como proteínas e gorduras, porém os carboidratos são utilizados como principal substrato energético muscular, cuja glicose pode ser oxidada gerando energia ou armazenada em forma de glicogênio (WELLS, SELVADURAI and TIEN, 2009; JENSEN *et al.*, 2011, TARNOPOLSKY, 2018). Quando a ingestão de glicose excede a necessidade fisiológica momentânea, ocorre o seu armazenamento no fígado e no tecido muscular (HEARRIS *et al.*, 2018). Após a entrada e fosforilação da glicose no tecido muscular, a enzima fosfoglicomutase-1 (PGM1) inicia o processo de síntese do glicogênio, comprometendo a glicose com essa via e, a formação da molécula de glicogênio é finalizada pela enzima glicogênio sintase (GYS1). Quando a demanda energética excede ao fluxo de glicose nos músculos esqueléticos, como durante o exercício físico, os polímeros de glicose que compõe a molécula de glicogênio entram na via glicolítica pela sua degradação, catalisada pela enzima glicogênio fosforilase (PYGM) (HEARRIS *et al.*, 2018; TARNOPOLSKY, 2018; EVANS *et al.*, 2019). No nosso estudo, a proteína de síntese de glicogênio muscular (GYS1) estava desregulada no proteoma dos animais

RS e RT, nos músculos SOL e PL, respectivamente, enquanto a enzima catalizadora do processo de glicogenólise (PYGM) apresentou-se comum entre as comparações estabelecidas em ambos os músculos.

No músculo SOL, o aumento da expressão da proteína GYS1 acompanhada pela diminuição da proteína PYGM no proteoma dos animais RS, indica um possível desbalanço na homeostase entre os processos de glicogênese e glicogenólise muscular. Gosby *et al.* (2003) observaram um aumento de glicogênio hepático na prole proveniente da RPM (8%, gestação e lactação) aos 10 e 26 dias, com expressão gênica aumentada da glicogênio sintase aos 10 dias e redução da atividade da glicogênio fosforilase aos 26 dias. Zheng *et al.* (2012) observaram um aumento na expressão gênica e proteica da GYS1 no músculo gastrocnêmico da prole fêmea aos 38 dias, de genitoras submetidas a restrição alimentar durante a gestação. Os animais do grupo RT do presente estudo, apresentaram uma reversão do padrão de expressão proteômica das enzimas do glicogênio, observamos uma diminuição na expressão da GYS1 e níveis aumentados da PYGM. Segundo Jensen *et al.* (2011) a prática de exercício físico promove a redução do glicogênio muscular esquelético permitindo um armazenamento pós prandial saudável de carboidratos, podendo prevenir o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Nossos dados sugerem que a RPM induz um acúmulo de glicogênio muscular e que a prática de EFA atenua as alterações no metabolismo do glicogênio provenientes desse insulto, principalmente em músculos com metabolismo oxidativo, como o SOL.

O músculo PL, por outro lado, apresentou aumento na expressão das proteínas PYGM nos animais RS e RT, e GYS1 nos animais RT, indicando um aumento no catabolismo do glicogênio muscular proveniente da RPM, e uma regulação na homeostase das vias de glicogênese e glicogenólise muscular devido a prática EFA, o que também foi apontado pelo enriquecimento de termos ontológicos/vias moleculares. Alguns autores indicam a degradação do glicogênio como forma de manutenção no metabolismo glicolítico muscular (BISSONNETTE and JEEJEEBHOY, 1998). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente, que o músculo glicolítico (EDL) em animais senis provenientes da RPM apresentam uma manutenção do seu metabolismo (VALENTE *et al.*, 2021). Assim, é possível que a RPM promova a manutenção no metabolismo glicolítico nesse tipo muscular, nos estágios mais precoces, como em ratos adultos, o que é mantido durante a senilidade e pela prática de EFA nesses animais.

Além de armazenada, a glicose pode ser oxidada após a entrada no tecido muscular gerando energia por duas vias dependentes da condição fisiológica (aeróbica ou anaeróbica), tornando essa via metabólica universal e adaptada às diferentes demandas funcionais (WELLS,

SELVADURAI and TIEN, 2009; OHLENDIECK, 2010; TARNOPOLSKY, 2018; COSTA *et al.*, 2021). A via glicolítica leva a redução da glicose a lactato em condições anaeróbicas, enquanto em condições aeróbicas, após a oxidação completa da glicose, a via oxidativa segue por meio da respiração celular, composta pelo ciclo do ácido cítrico (TCA) e cadeia respiratória, gerando por fim, um grande saldo de moléculas energéticas, o ATP (EVANS *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2021). A via da glicólise é dividida em duas fases, na qual a fase de investimento tem por finalidade a formação de duas moléculas trioses (gliceraldeide-3-fosfato), com a utilização de 2 moléculas de ATP, sendo catalisada por 5 enzimas (hexoquinase - HK, glicose-6-fosfato isomerase - GPI, fosfofrutoquinase - PKF, frutose-bifosfato aldolase A - ALDOA e triosefosfato isomerase - TPI1). A fase subsequente, de rendimento energético, é composta pela conversão do gliceraldeide-3-fosfato em piruvato, através de 5 enzimas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH, fosfoglicerato quinase -PGK, fosfoglicerato mutase - PGAM, enolase - ENO e piruvato quinase - PK), fornecendo 4 moléculas energéticas, além dos equivalentes redutores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina nucleotídeo (FADH₂) (FERNIE *et al.*, 2004; BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010).

Em ambos os músculos estudados, SOL e PL, o processos metabólico da glicose foi o termo ontológico/via molecular enriquecido por mais PDEs (9 proteínas em cada músculo), sendo grande parte delas compondo o processo de metabolismo energético muscular (19 PDES no músculo SOL e 14 no músculo PL).

No músculo SOL dos animais RS, 5 enzimas que catalisam o processo da glicólise (ALDOA, ALDOC, TPI1, ENO1 e PGAM2), apresentaram diminuição na expressão no perfil proteômico, indicando que a oxidação da glicose está decrescida nesta condição e, corroborando com o aumento na síntese de glicogênio muscular nos animais submetidos a RPM. Por outro lado, o aumento da expressão dessas enzimas no proteoma do grupo RT, assemelhando-se ao padrão de expressão proteômico dos animais CS, sugere que o EFA retomou a via glicolítica de obtenção energética nos animais submetidos a RPM, atenuando as alterações no metabolismo da glicose, o que também pode refletir na diminuição do acúmulo de glicogênio muscular. Como o tecido muscular é responsável pela eliminação de até 75% da glicose corporal (BLESSON *et al.*, 2014), esses dados são mais um indício de que a prática regular de EFA pode ser realizada como forma de atenuar ou reverter possíveis futuras disfunções metabólicas provenientes da RPM.

De outro modo, no músculo PL, o aumento na expressão de 8 enzimas catalisadoras do processo da glicólise (ALDOA, ALDOC, TPI1, GAPDH, GAPDHS, PGK1, PGAM2 e PKM) no proteoma dos grupos RS e RT, refletem a conservação desta via em resposta a RPM, o que

foi exacerbado pela prática de EFA. Bissonnette e Jeejeebhoy (1998) já sugeriram que, em animais alimentados com uma dieta de baixa energia, seguida de realimentação adequada e estimulação de contração, os músculos glicolíticos apresentam uma manutenção do seu metabolismo como forma de resistência a fadiga, através de um aumento na atividade glicolítica, uma glicogenólise “supernormal”, e aumento do lactato muscular. Esse fato vai ao encontro com nossos achados, visto que o proteoma do músculo PL também demonstrou que a proteína lactato desidrogenase A (LDHA) estava aumentada nos animais RS e RT, associada a uma tendência no aumento da expressão do mRNA *Ldha*, além do aumento do catabolismo do glicogênio e da glicose. Já no músculo SOL, observamos uma diminuição na LDHA pelo proteoma e na expressão do mRNA *Ldha*, além da diminuição no catabolismo do glicogênio e da glicose nos animais provenientes da RPM. Por outro lado, nos animais RT, houve aumento na LDHA pelo proteoma, e atenuação nas alterações do glicogênio e da glicose, provenientes do EFA. Todos esses dados mostram que, a RPM levou a diminuição do metabolismo da glicose no músculo SOL (metabolismo oxidativo) e a manutenção desta via no músculo PL (metabolismo glicolíticos); a prática de EFA atenuou as alterações metabólicas glicolíticas no músculo SOL, exacerbando os efeitos da RPM no músculo PL.

As alterações no proteoma muscular observadas no nosso estudo, envolvendo as enzimas glicolíticas, foram descritas em outros modelos animais, como bovinos, suínos e coelhos, em resposta a diversos estímulos (PÉREZ *et al.*, 1998; LAMETSCH *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010). Lametsch *et al.* (2006) observaram uma redução na expressão das enzimas GAPDH e ENO 3 no proteoma muscular de suínos com crescimento compensatório após um período de restrição alimentar, sugerindo uma diminuição no potencial glicolítico desses animais. Liu *et al.* (2014) sugerem que o baixo peso ao nascimento em suínos, causa um efeito a longo prazo no metabolismo glicolítico muscular devido a diminuição da expressão das proteínas PGAM e PKM, observadas pela análise do proteoma muscular, e quando alimentados com uma dieta de alto teor de gordura, a proteína TPI também se mostrou diminuída. Esses dados suportam a hipótese de que a RPM altera o metabolismo glicolítico muscular, apontado no nosso estudo, no músculo SOL. Por outro lado, Jia *et al.* (2007), relacionam o aumento da enzima ENO1 no proteoma muscular bovino, com a manutenção de produção de ATP devido às altas taxas de glicólise, o que corrobora com nossos achados, visto que todas as enzimas da fase de geração de energia da glicólise estavam super expressas no proteoma dos animais RS e RT, no músculo PL. Também, corroboram com nossa hipótese de que a diminuição das enzimas da via da glicólise promove um declínio acentuado desse metabolismo no músculo SOL.

As vias do glicogênio e da glicose apresentam moléculas em comum, as quais podem ser substrato ou produto de uma reação, dependendo das demandas funcionais e via molecular a ser seguida (OHLENDIECK, 2010). Após a entrada no tecido muscular, por transportadores específicos, como o GLUT4, a glicose é fosforilada pela enzima HK formando a glicose-6-fosfato, sendo esse o primeiro ponto limitante da via da glicólise, devido ao aprisionamento da molécula de glicose, podendo então seguir a via da glicogênese, sintetizando glicogênio, ou a via da glicólise, para ser oxidada em piruvato (OHLENDIECK, 2010; BAKER, MCCORMICK and ROBERGS, 2010).

Embora alguns autores tenham demonstrado alterações no transportador GLUT4 e na enzima HK, proveniente da RPM (ARAGÃO *et al.*, 2014; de BRITO ALVES *et al.*, 2017), no presente estudo, ambos não se mostraram desregulados nos músculos SOL e/ou PL, devido a RPM e/ou EFA, sendo a HK a única das 10 enzimas da via da glicólise não identificada pelo proteoma. Esse fato é um indicativo que, o substrato para a síntese do glicogênio no músculo SOL e para a manutenção da glicólise no músculo PL, estivesse disponível em concentrações ideais para que essas vias se mantivessem ativas, ainda que a concentração de glicose sanguínea nos animais RS se mantivesse alta (dados do TTGO). É possível que, a persistência nas alterações no metabolismo da glicose observadas no músculo SOL, influencie em futuras desregulações musculares no transporte (GLUT4) e aprisionamento citoplasmático da molécula de glicose (HK), levando a distúrbios sistêmicos, como diabetes e/ou resistência à insulina.

Outro ponto que reforça nossa hipótese de que a oxidação da glicose está comprometida pela RPM no músculo SOL, é a diminuição na expressão das demais enzimas da via da glicólise no proteoma dos animais RS comparado ao CS. Juntamente com as demais enzimas citadas acima, a GPI, GAPDH e PGK1, além das enzimas PFKM e PKM, pontos limitantes da via da glicólise, estavam diminuídas no proteoma do músculo SOL no grupo RS. A PFKM, é a segunda enzima limitante desta via, sendo o ponto de comprometimento do substrato com a via glicolítica (HEARRIS *et al.*, 2018), enquanto a PKM é o último ponto limitador, gerando energia na conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato (ZANELLA *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2020).

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que mostra, através da análise proteômica, a grande maioria das enzimas catalíticas da via da glicólise muscular alteradas, em ratos adultos provenientes da RPM. O estudo também demonstrou uma resposta diferencial dependente do tipo muscular, onde houve regulação negativa de 8 das 10 enzimas da glicólise, indicando um decréscimo desta via no músculo oxidativo SOL, e regulação positiva de 7 das 10 enzimas apontando uma manutenção metabólica, no músculo glicolítico PL.

Os termos ontológicos/vias moleculares do metabolismo de piruvato e cadeia respiratória também foram enriquecidos pelas PDEs comuns nas três comparações, estabelecidas no proteoma de ambos os músculos analisados, além do TCA no músculo SOL, apontando alterações na via oxidativa por meio da respiração celular.

Como ligação da via glicolítica ao TCA, as moléculas de piruvato são convertidas em acetil-CoA pelas subunidades mitocondriais componentes do complexo piruvato desidrogenase (PDHC), um importante regulador da homeostase da glicose (HOLMESS *et al.*, 2000; STRUMILO, 2005). A principal forma de regulação e inativação do PDHC ocorre pela fosforilação das suas subunidades pela atividade das isoenzimas piruvato desidrogenase quinases (PDK), diminuindo assim a utilização de glicose e aumentando a oxidação de ácidos graxos (HOLMESS *et al.*, 2000; STRUMILO, 2005). Curiosamente, no nosso estudo, a proteína piruvato desidrogenase E1 componente da subunidade β (PDHB) do PDHC, estava aumentada nos animais provenientes da RPM (RS) e diminuída devido ao EFA nesses animais (RT). Como o proteoma do músculo SOL dos animais RT, mostrou também a isoenzima PDK2 aumentada, isso poderia explicar os níveis diminuídos da PDHB no proteoma desses animais, indicando uma possível inibição do PDHC pelo EFA, controlando assim a taxa da glicólise e formação do piruvato, que se já encontra diminuída nestes animais, devido a RPM.

Outro ponto a ser considerado é que o substrato acetil-CoA, pode ser derivado de outras fontes, como a oxidação de ácidos graxos, além da regulação pela PDK incluir a diminuição da concentração de piruvato proveniente da glicólise ou do lactato (HOLMESS *et al.*, 2000). Aparentemente, a RPM aumenta o catabolismo lipídico, via da β -oxidação de ácidos graxos, apontado no nosso estudo por esse termo ontológico/via molecular, em ambos os músculos analisados, com aumento da expressão no proteoma muscular das enzimas peroxissomal acil-CoA oxidase 2 (ACOX2), no músculo SOL e PL, e mitocondrial acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta (ACADS) no músculo SOL. A prática de EFA também reverteu esse padrão de expressão em ambos os músculos, nesses animais.

Seguindo a via energética aeróbica, o TCA é o principal segmento comum da oxidação de carboidratos e ácidos graxos, no qual ocorre a interconversão do acetil-CoA, resultando na produção de energia e poder redutor, para culminar na fosforilação oxidativa com a obtenção de grandes quantidades de ATP (FERNIE *et al.*, 2004). Alguns autores relatam funções prejudicadas nas mitocôndrias musculares devido a restrição alimentar materna (ZHU *et al.*, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2014; BEAUCHAMP *et al.*, 2014), bem como a influência mitocondrial positiva devido a prática do exercício físico (HOOD *et al.*, 2019; GREVENDONK *et al.*, 2021). No proteoma do músculo SOL dos animais submetidos a RPM (RS), as enzimas mitocondriais

envolvidas com os termos de enriquecimento/vias moleculares do TCA e da cadeia respiratória apresentaram-se diminuídas, e o padrão de expressão foi retomado pela prática de EFA, ainda que o mRNA do marcador de biogênese mitocondrial coativador γ do receptor ativador proliferador de peroxissoma (*Pgc1 α*) não estivesse alterado devido a RPM nos animais RS no DPN 150.

A diminuição das, primeira e última, enzimas do TCA, citrato sintase (CS), relatada como um marcador da capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial (ARAGÃO *et al.*, 2014), e malato desidrogenase (MDH2), considerada um importante regulador do fluxo do ciclo (MINÁRIK *et al.* 2002; NUNES-NESI *et al.*, 2013), além de componentes da cadeia respiratória, como a subunidade 2 da citocromo c oxidase (MTCO2), as subunidades α e β da ATP sintase (ATP5F1A e ATP5F1B) e a subunidade 1 do complexo citocromo b-c1 (UQCRC1) (PAPA *et al.*, 2012; NOLFI-DONEGAN, BRAGANZA and SHIVA, 2020), no músculo oxidativo SOL, indicam uma possível limitação da obtenção de energia pelo metabolismo oxidativo muscular na condição de RPM, que foi retomado pelo EFA.

Em linhas gerais, acreditamos que, como forma de proteção para o músculo SOL, nos animais provenientes da RPM, a via da glicólise seja diminuída para que ocorra uma reserva muscular, e a energia metabólica seja obtida pela oxidação de ácidos graxos. A utilização da glicose em situações aeróbicas e anaeróbicas faz com que seja uma preferência para reserva e utilização energética em eventos importantes para a sobrevivência do animal (como luta, fuga ou busca de alimentos), possibilitando assim uma disponibilidade energética rápida, visto que, como forma de sobrevivência, órgãos como o coração e o cérebro possuem uma pequena reserva de glicogênio para geração de energia imediata e anaeróbica, a curto prazo (JENSEN *et al.*, 2011). Porém a desregulação nessas vias metabólicas pode resultar em distúrbios fisiológicos e metabólicos nesses animais com o decorrer da idade.

A prática de EFA é uma intervenção positiva para a retomada no metabolismo da via energética glicolítica em animais provenientes da RPM, diminuindo a concentração de glicose sanguínea, retomando o padrão na expressão de enzimas da via do glicogênio e oxidação lipídica muscular, bem como das enzimas do processo da glicose, TCA e fosforilação oxidativa, indicando uma homeostase nas vias energéticas e evitando possíveis distúrbios metabólicos devido as alterações no armazenamento e utilização da glicose, no músculo oxidativo. O músculo PL, por outro lado, como forma de adaptação em resposta a RPM, mantém seu metabolismo glicolítico, devido ao aumento da utilização do glicogênio e da glicose muscular, o que se exacerba com a prática de EFA.

6.1 Resumo Gráfico

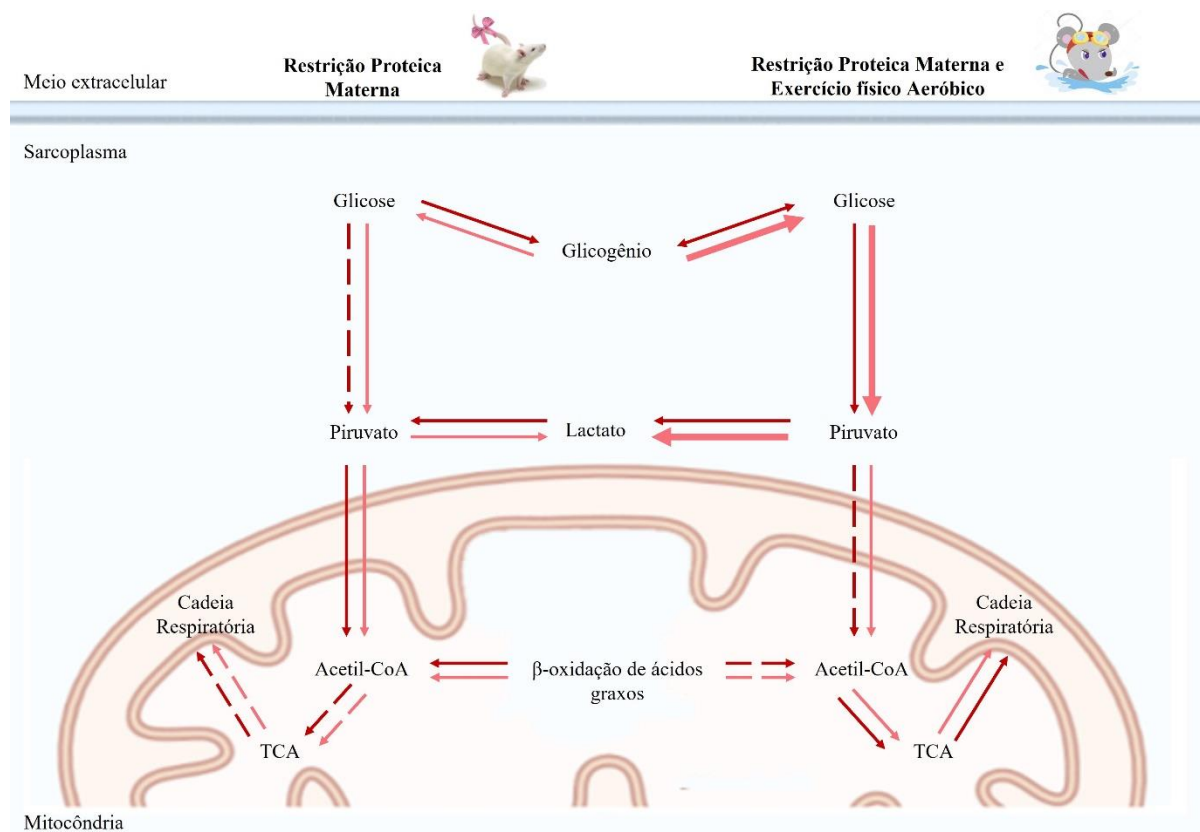


Figura 30. Resumo gráfico das vias energéticas alteradas pela restrição proteica materna e pelo exercício físico aeróbico. Setas vermelhas: músculo SOL. Setas rosas: músculo PL. Setas contínuas: vias induzidas. Setas tracejadas: vias diminuídas. Setas grossas: vias exacerbadas.

7 CONCLUSÃO

A restrição proteica materna alterou o peso corporal, com efeito de crescimento acelerado corporal e muscular, diminuiu a via energética da glicose e respiração celular, com acúmulo de glicogênio no músculo SOL, e exacerbou a via energética da glicose e o catabolismo do glicogênio no músculo PL, sem mostrar indícios de doenças metabólicas, como obesidade, resistência à insulina ou diabetes.

O exercício físico aeróbico atenuou o efeito de crescimento acelerado e as alterações metabólicas glicolíticas no músculo SOL, intensificando esta via, no músculo PL. Nossos resultados apontam o exercício físico aeróbico como benéfico para a atenuação das alterações morfológicas e metabólicas do músculo esquelético, principalmente no músculo SOL, em ratos adultos submetidos à restrição proteica materna perinatal. O trabalho contribuiu também para uma melhor compreensão das redes moleculares envolvidas com as adaptações morfofisiológicas musculares decorrentes da restrição proteica materna perinatal, em ratos adultos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R. S. A. *et al.* Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Mol. Biosyst.**, v. 5, n. 12, p. 1512-1526, 2009.
- ADEVA-ANDANY, M. M. *et al.* Glycogen metabolism in humans. **BBA Clin.**, v. 5, p. 85-100, 2016.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Proteomic investigation of the effects of weight loss in the gastrocnemius muscle of wild and NZW rabbits via 2D-electrophoresis and MALDI-TOF MS. **Anim. Genet.**, v. 41, n. 3, p. 260-272, 2010.
- ANDRADE, F. O. *et al.* Lipidomic fatty acid profile and global gene expression pattern in mammary gland of rats that were exposed to lard-based high fat diet during fetal and lactation periods associated to breast cancer risk in adulthood. **Chem. Biol. Interact.**, v.239, p. 118-128, 2015.
- ARAGÃO, R. S. *et al.* Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta. Physiol. (Oxf)**, v. 210, n. 1, p. 70-83, 2014.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* Skeletal muscle regulates metabolism via interorgan crosstalk: roles in health and disease. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 17, n. 9, p. 789-796, 2016.
- ASLAM, B. *et al.* Proteomics: technologies and their applications. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 55, n. 2, p.182-196, 2017.
- BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. **Acta. Physiol. (Oxf)**, 2010 Aug;v. 199, n. 4, p. 477-487, 2010.
- BAKER, J. S.; MCCORMICK, M. C. and ROBERGS, R. A. Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. **J. Nutr. Metab.**, 2010.
- BARKER, D. J. P. *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 1989a.
- BARKER, D. J. P. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, 1989b.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, v. 301, n. 6761, p. 1111, 1990.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. and LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **J. Epidemiol. Community Health**, 1989 Sep;v. 43, n. 3, n 237-240, 1989.
- BEAUCHAMP, B. and HARPER, M. E. In utero undernutrition programs skeletal and cardiac muscle metabolism. **Front. Physiol.**, v. 6, n. 401, p. 1–7, 2016.

- BEAUCHAMP, B. *et al.* Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. **Int. J. Obes.**, v. 39, n. 4, p. 702-711, 2014.
- BISSONNETTE, D. J. and JEEJEEBHOY, K. N. Feeding a low energy diet and refeeding a control diet affect glycolysis differently in the slow- and fast-twitch muscles of adult male Wistar rats. **J. Nutr.**, v. 128, n. 10, p. 1723-30, 1998.
- BLESSON, C. S. *et al.* Gestational protein restriction impairs insulin-regulated glucose transport mechanisms in gastrocnemius muscles of adult male offspring. **Endocrinol.**, v.155, n. 8, p. 3036-3046, 2014.
- BODINE, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001.
- BONALDO, P. and SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Dis. Model. Mech.**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.
- BOWTELL, J. *et al.* Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative metabolism in exercising human skeletal muscle. **Sports Med.**, v. 37, n. 12, p. 1071-1088, 2007.
- BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CABEÇO, L. C. *et al.* Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and myogenin expression in offspring. **J. Mol. Histol.**, v. 43, n.5, p. 461–471, 2012.
- CARPINELLO, O. J.; DECHERNEY, A. H. and HILL, M. J. Developmental Origins of Health and Disease: the history of the barker hypothesis and assisted reproductive technology. **Semin. Reprod. Med.**, v. 36, n. 3–4, p. 177–182, 2018.
- CARUSO, F. R. *et al.* Resistance exercise training improves heart rate variability and muscle performance: a randomized controlled trial in coronary artery disease patients. **Eur. J. Phys. Rehabil. Med.**, v. 51, n. 3, p. 281-289, 2015.
- CHO, W. K. and SUH, B. Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age. **Korean J. Pediatr.**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2016.
- CONFORTIM, H. D. *et al.* Effects of aging and maternal protein restriction on the muscle fibers morphology and neuromuscular junctions of rats after nutritional recovery. **Micron**, v. 71, p. 7–13, 2015.
- CORVINO, S. B. *et al.* Intrauterine Growth Restricted Rats Exercised before and during pregnancy: Maternal and Perinatal Repercussions. **Reprod. Sci.**, v. 22, n. 8, 2015.

COSTA, T. C. *et al.* Impact of maternal feed restriction at different stages of gestation on the proteomic profile of the newborn skeletal muscle. **Animals (Basel)**, v. 12, n. 8, 2022.

DA SILVA, D. *et al.* Metformin reverses hexokinase and 6-phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 496, n. 1, p. 53-60, 2010.

DAWSON, D. M.; GOODFRIEND, T. L. and KAPLAN, N. O. Lactic dehydrogenases: functions of the two types rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. **Science**, v. 143, n. 3609, p. 929-33. 1964.

de BRITO ALVES, J. L. *et al.* Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. **J. Nutr. Biochem.**, v. 41, p. 117-123, 2017.

de MELO, J. F. *et al.* Effect of a neonatal low-protein diet on the morphology of myotubes in culture and the expression of key proteins that regulate myogenesis in young and adult rats. **Eur. J. Nutri.**, v. 50, n. 4, p. 243-50, 2011.

DUBOWITZ, V. and PEARSE, A. G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochem.**, v. 2, n. 2, p. 105–17, 1960.

DUNFORD, E. C. *et al.* PDH activation during in vitro muscle contractions in PDH kinase 2 knockout mice: effect of PDH kinase 1 compensation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. R1487-93, 2011.

ERGEN, N. *et al.* The effects of aerobic exercise on skeletal muscle metabolism, morphology and in situ endurance in diabetic rats. **J. Sports. Sci. Med.**, v. 4, n. 4, p. 472-481, 2005.

EVANS, P. L. *et al.* Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2432, 2019.

FANTINATTI, B. E. A. *et al.* Integrative microRNAome analysis of skeletal muscle of *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), and the hybrid tambacu, based on next-generation sequencing data. **BMC Genomics**, n. 22, v. 1, p. 237, 2021.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO.

FERNIE, A. R., CARRARI, F. and SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Curr. Opin. Plant. Biol.**; v. 7, n. 3, p. 254-261, 2004.

FIDALGO, M. *et al.* Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br. J. Nutr.**, v. 109, n. 3, p. 449-456, 2013.

FINKIELSTAINA, G. P.; LUIB J.C. and BARONB J. Catch-up growth: cellular and molecular mechanisms. **World Ver. Nutr. Diet.**, v. 106p. 100-104, 2013.

- FONSEKA, P. et al. FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. **J Mol Biol**, v. 433, n. 11, 2021.
- FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, A. D. and FORHEAD, A. J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *physiology*, v. 21, n.1, p. 29–37, 2006.
- FRITZEN, A. M.; LUNDSGAARD, A. and KIENS, B. Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 16, n. 12, p. 683-696, 2020.
- FRONTERA, W. R. and OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcif Tissue Int.**, v. 96, n. 3, p. 183-95, 2015.
- GALLAGHER, J. P. *et al.* Insights into the ecology and evolution of polyploid plants through network analysis. **Mol Ecol.**, v. 25, n. 11, p. 2644-2660, 2016.
- GELFI, D. *et al.* 2-D protein maps of rat gastrocnemius and soleus muscles: a tool for muscle plasticity assessment. **Proteomics.**, v. 6, n. 1, p. 321-340, 2006.
- GICQUEL, C.; EL-OSTA, A. and LE BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2008.
- GOSBY, A. K. *et al.* Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. **Pediatr. Res.**, v. 54, n. 3, p. 413-8, 2003.
- GREVENDONK, L. *et al.* Impact of aging and exercise on skeletal muscle mitochondrial capacity, energy metabolism, and physical function. **Nat. Commun.**, v. 12, p. 4773, 2021.
- GUDIENSEN, A. *et al.* Training state and fasting-induced PDH regulation in human skeletal muscle. **Pflugers Arch.**, v. 470, n. 11, p. 1633-1645, 2018.
- GUTIÉRREZ-ARZAPALO, P. Y. *et al.* Role of fetal nutrient restriction and postnatal catch-up growth on structural and mechanical alterations of rat aorta. **J. Physiol.**, v. 596, n. 23, p. 5791-5806, 2018.
- HALES, C. N. and BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia.**, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.
- HALL, M. M. *et al.* Lactate: friend or foe. **PMR**, p. S8-S15, 2016.
- HARGREAVES, H. Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 27, n.3, p. 225-228, 2000.
- HEARRIS, M. A. *et al.* Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 298-319, 2018.
- HO, S. S. *et al.* The effect of 12 weeks of aerobic, resistance or combination exercise training on cardiovascular risk factors in the overweight and obese in a randomized trial. **BMC Public Health**, n. 12, p. 704, 2012.

- HOLNESS, M. J. *et al.* Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. **Diabetes.**, v. 49, n. 5, p. 775-781, 2000.
- HOOD, D. A. *et al.* Maintenance of skeletal muscle mitochondria in health, exercise, and aging. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 10, n. 81, p. 19-41, 2019.
- HOPPELER, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. **International Int J. Sports Med.**, v. 7, n. 4, p. 187-204, 1986.
- HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science.**, v. 164, p. 1356-65, 1969.
- JELINEK, B. A and MOXLEY, M. A. Detailed evaluation of pyruvate dehydrogenase complex inhibition in simulated exercise conditions. **Biophys. J.**, v. 120, n. 5, p. 936-949, 2021.
- JENSEN, J. *et al.* The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Front. Physiol.**, v. 2, n. 112, 2011.
- JIA, X. *et al.* Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. **J. Proteome Res.**, v. 6, n. 7, p. 2720-2731, 2007.
- JIMENO-ALMAZÁN, A. *et al.* Post-COVID-19 syndrome and the potential benefits of exercise. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**, v.18, n. 10, p. 5329, 2021.
- JOHNSON, R. A. and WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis, 6ed. P. 773, 2007.
- JONES, R. H. AND OZANNE S. E. Fetal programming of glucose–insulin metabolism. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 297, n. 1-2, p. 4-9, 2009.
- KANG, W. *et al.* Emerging role of TCA cycle-related enzymes in human diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 23, p. 13057, 2021.
- KELLY, A. M. and RUBINSTEIN, N. A, 2003. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. **Myology**. 3ª edição, v.1, p: 87-103, 2003.
- KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **Br. J. Pharmacol.**, v.160, 1577-1579, 2010.
- KIM, C. H. *et al.* Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 278, n. 6, p. E977-984, 2000.
- KIRÁLY, M. A. *et al.* Swim training prevents hyperglycemia in ZDF rats: mechanisms involved in the partial maintenance of β -cell function. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 294, n. 2, p. e271-83, 2008.
- KONOPKA, A. R. and HARBER, M. P. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. **Exerc. Sport. Sci. Ver.**, v. 42, n. 2, p. 53-61, 2014.

- KRÜGER, K. *et al.* Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. **PlosOne**, v. 8, n. 11, p. e79069, 2013.
- LAMETSCH, R. *et al.* Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 84, n. 4, p. 918-924, 2006.
- LEANDRO, C. G. *et al.* Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **Eur. J. Nutr.**, v. 51, n. 7, p. 807-815, 2012.
- LEDNEV, E. M. *et al.* Effect of amino acids on IGF1 gene expression in human myotubes and skeletal muscle. **Growth Horm. IGF Res.**, p. 101323, 2020.
- LIANG, X. *et al.* Exercise inducible lactate dehydrogenase b regulates mitochondrial function in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 291, n. 49, p. 25306-25318, 2016.
- LIMA LEITE, A. *et al.* Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. **PLoS One**, v. 9, p. e106646, 2014.
- LIN, T. C.; PETTIT, and REED, L. J. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 62, n. 1, p. 234-241, 1969.
- LIRA, A. O. *et al.* Maternal low protein diet induces persistent expression changes in metabolic genes in male rats. **World J. Diabetes**, v.11, n. 5, p. 182-192, 2020.
- LIU, J. *et al.* Birth weight alters the response to postnatal high-fat diet-induced changes in meat quality traits and skeletal muscle proteome of pigs. **Br J Nutr.**, v. 111, n. 10, p.1738-1747, 2014.
- LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) methods. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOBO, J.G. *et al.* Low-level fluoride exposure increases insulin sensitivity in experimental diabetes. **J. Dent. Res.**, v. 94, p. 990–997, 2015.
- LOWEY, S. *et al.* Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **J. Mol. Biol.**, v. 42, n. 1, p. 1-29, 1969.
- LU, X. *et al.* Vascular endothelial growth factor B promotes transendothelial fatty acid transport into skeletal muscle via histone modifications during catch-up growth. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 319, p. E1031-E1043, 2020.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp.**, v. 156, p. 38–50, 1991.

- LUNDGAARD, A.; FRITZE, A. M. and KIENS, B. Molecular regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle during aerobic exercise. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v. 1, p. 18-30, 2018.
- MACEDO, N. C. D. *et al.* Swimming program on mildly diabetic rats in pregnancy. **Reprod. Sci.**, v. 28, n. 8, p. 2223-2235, 2021.
- MCKINNELL, I. W. and RUDNICKI, M. A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. **Cell**, v. 119, n.7, p. 907–910, 2004.
- MINÁRIK, P. *et al.* Malate dehydrogenases--structure and function. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 21, n. 3, p. 257-265, 2002.
- MONTGOMERY, B. C. Design and analysis of experiments, 8ed. New York, 2012, 752 p.
- ZAR, J. H. Bioestatistical analyses, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall, p. 994, 2009.
- MURGIA, M. *et al.* Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 2, p. 142–147, 2000.
- MUROYA, S. *et al.* Maternal undernutrition during pregnancy alters amino acid metabolism and gene expression associated with energy metabolism and angiogenesis in fetal calf muscle. **Metabolites**, v. 11, n. 9, p. 582, 2021.
- NOLFI-DONEGAN, D. BRAGANZA, A. and SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biol.**, v. 37, p. 101674, 2020.
- NORMAN, G. R. and STREINER, D. L. Biostatistics: the bare Essentials, 3ed. St. Louis: Mosby Yearbook, p. 393, 2008.
- NUNES-NESI, A. *et al.* Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v. 16, n. 3, p. 335-343, 2013.
- OHLENDIECK, K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1804, n. 11, p. 2089-2101, 2010.
- OKOMURA, N. *et al.* Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. **Proteomics**, n. 5, v. 11, p. 2896-2906, 2005.
- PAPA, S. *et al.* The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. **Adv. Exp. Med. Biol.**, p. 3-37, 2012.
- PÉREZ J. X. *et al.* Effect of starvation on gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 22, n. 7, p. 667-672, 1998.
- PERTILLE, A. *et al.* Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Braz. J. Biol.**, v.77, n.1., p. 83-91, 2016.

- PETTE, D. and STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions1. **Microsc. Res. Tech.**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 2000.
- QAISAR, R.; BHASKARAN, S. and REMMEN, H. V. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 98, p. 56-67, 2016.
- RAFACHO, A. *et al.* Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, p. 284–293, 2008.
- REDDY, R. *et al.* Effect of aerobic and resistance exercise on glycemic control in adults with type 1 diabetes. **Can. J. Diabetes**, v. 46, n. 6, p. 406-414, 2019.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. and FAHEY, G. C. 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, p. 1939-1951, 1993.
- RICH, P. R. and MARÉCHAL, A. The mitochondrial respiratory chain. **Essays. Biochem.**, n. 47, p. 1-23, 2010.
- RINALDI, J. C. *et al.* Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763-774, 2013.
- ROACH, P. J. *et al.* Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochem. J.**, v. 441, n. 3, p. 763-87, 2012.
- ROWLAND, L. A.; BAL, C. N. and PERIASAMY, M. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. **Biol. Ver. Camb. Philos. Soc.**, v. 90, n. 4, p. 1279-97, 2015.
- RUIZ-ROSADO, A. *et al.* Histoenzymatic and morphometric analysis of muscle fiber type transformation during the postnatal development of the chronically food-deprived rat. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 61, n. 5, p. 372–381, 2013.
- SANDOVAL, C. *et al.* Effect of maternal nutrient restriction on expression of glucose transporters (SLC2A4 and SLC2A1) and insulin signaling in skeletal muscle of SGA and Non-SGA sheep fetuses. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 74, p. 1-14, 2021.
- SÄNGER, A. and STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. **Fish physiology**, v. 18, p. 187–250, 2001.
- SANTOS, S. A. A. *et al.* Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, n. 20, p.19954-19978, 2020.
- SARTORELLI, V. and FULCO, M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. **Sci. STKE**, v. 2004, n. 244, p. 1–10, 2004.
- SCHIAFFINO, S. and REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol. Rev.**, v. 91, n. 4, p. 1447-531, 2011.

- SCHIAFFINO, S. and REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 77, n. 2, p. 493-501, 1994.
- SCHIAFFINO, S. *et al.* Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J.**, v. 280, n. 17, p. 4294-314, 2013.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. and ELICEIRI, K. W. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.
- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 2010.
- SHARPLES, A. P.; STEWART, C. E. and SEABORNE, R. A. Does skeletal muscle have an “epi”- memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. **Aging Cell**, v. 15, n. 4, p. 603–616, 2016.
- SHI, L and TU, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 33, p. 125-131, 2015.
- SILLAU, A. H. and BANCHERO, N. Skeletal muscle fiber size and capillarity. **proc soc exp Bio Med.**, v. 158, n. 2, p. 288–291, 1978.
- SOUZA, R. W. A. *et al.* Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. **Plos one**. v. 9, n. 10, p. e110020, 2014.
- SPRIET, L. L.; HOWLETT, R. A. and HEIGENHAUSER, G. J. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 32, n. 4, p. 756-63, 2000.
- STEARNS-REIDER, K. M. *et al.* Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. **Aging Cell**. v. 16, n. 3, p. 518-528, 2017.
- STEVEN, A. and BANCROFT, J. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed New York: Churchill Livingstone, 1990.
- STRUMILO, S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. **Acta Biochim Pol.**, v. 52, n. 4, p. 759-764, 2005.
- TARNOPOLSKY, M. A. Myopathies related to glycogen metabolism disorders. **Neurother.**, v. 15, n. 4, p. 915-927, 2018.
- TEIXEIRA-DE-LEMOES, E. *et al.* Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. **Mediators Inflamm.**, v. 2011, 2011.
- THOMPSON, L. V. Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. **J. Orthop. Sports Phys. Ther.**, v. 32, n. 2, p. 44-57, 2002.

- TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. and CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270–278, 2008.
- UBAIDA-MOHIEN, C. *et al.* Discovery proteomics in aging human skeletal muscle finds change in spliceosome, immunity, proteostasis and mitochondria. **eLIFE**, 2019.
- VAAG, A. *et al.* Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. **Horm Res.**, v. 65, p. 137-143, 2006.
- VALENTE, J. S. *et al.* Maternal protein restriction changes structural and metabolic gene expression. in the skeletal muscle of aging offspring rats. **Histol. Histopathol.**, v. 36, p. 853-867 2021.
- VECHETTI-JÚNIOR, I. J. *et al.* NFAT isoforms regulate muscle fiber type transition without altering can during aerobic training. **Int. J. Sports Med.**, v. 34, p. 861-867, 2013.
- VISKER, J. R. *et al.* Postnatal growth restriction in mice alters cardiac protein composition and leads to functional impairment in adulthood. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 24, p. 9459, 2020.
- VOGEL, C. and MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Ver. Genet.**, v. 13, p. 227–232, 2012.
- VOLTARELLI, F. A; GOBATTO, C. A and MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian J. of Med. Biol. Resear.**, p. 1389-94, 2002.
- WADHWA, P. D. *et al.* Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Semin. Reprod. Med.**, v. 27, n. 5, p. 358–368, 2009,
- WASSERMAN, K. and MCILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Amer. J. of Cardiol.**, v. 14, p. 844-852, 1964.
- WELLS, G. D.; SELVADURAI, H. and TEIN, T. Bioenergetic provision of energy for muscular activity. *Paediatr. Respir. Ver.*,v. 10, n. 3, p. 83-90, 2009.
- WESTERBLAD, H.; BRUTON, J. D. and KATZ, A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Exp. Cell Res.**, v. 316, n. 18, p. 3093-3099, 2010.
- WITTIG, I. and SCHÄGGER, H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1787, n. 6, p. 672-680, 2008.
- XIANG, C. *et al.* Increased glycolysis in skeletal muscle coordinates with adipose tissue in systemic metabolic homeostasis. **J. Cell. Mol. Med.**, n. 16, p. 7840-7854, 2021.
- XIE, C. *et al.* KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. W316–W322, 2011.

XING, Y. *et al.* Reduction of the PI3K/Akt related signaling activities in skeletal muscle tissues involves insulin resistance in intrauterine growth restriction rats with catch-up growth. **Plos One**, v. 14, n. 5, p. e0216665, 2019.

XU, C. *et al.* Reduction of mitochondria and up regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 of skeletal muscle in patients with chronic kidney disease. **Nephrology. (Carlton)**, n. 3, p. 230-238, 2020.

YANG, W. Decreased blood glucose and lactate: is a useful indicator of recovery ability in athletes? **Int. J. Environ. Res. Public. Health.**, v. 17, n. 15, p. 5470, 2020.

YATES, J. R; RUSE, C. I and NAKORCHEVSKY A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 11, p. 49-79, 2009.

ZANELLA, A., BIANCHI, P. and FERMO, E. Pyruvate kinase deficiency. **J. Hemat.**, n. 92, v. 06, p. 721-723, 2007.

ZENG, Y. *et al.* Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1 α expression via altered DNA methylation in skeletal muscle. **Mol. Med. Rep.**, n. 1, p. 306-312, 2013.

ZHANG, G. *et al.* Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. **Curr. Protoc. Protein. Sci.**, 2010.

ZHANG, S. *et al.* The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. **Nutr. Metab. (Lond.)**, v. 11, n. 1, p. 10, 2014.

ZHENG, S.; ROLLET, R. and PAN, Y. Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4 expression in skeletal muscle of female rat offspring. **J. Nutr. Biochem.**, v. 23, n. 9, p. 1064-1071, 2012.

ZHU, M. J. *et al.* Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. **Biol. Reprod.**, v. 71, n. 6, p. 1968–1973, 2004.

ZHU, M. J. *et al.* Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J. Physiol.**, v. 15, n. 575, p. 241-250, 2006.

ZHU, S. *et al.* Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy. **Plos one**, v. 14, n. 8, p. e0221366, 2019.

ANEXOS

ANEXO 1. Padrão de expressão das 244 proteínas encontradas pelo MS/MS nas comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS, no músculo SOL.

ID UniprotKB	Protein name	CTxCS	RSxCS	RTxRS
P35213	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	UR	UR	DR
P62260	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	UR	UR	DR
P68511	<i>14-3-3 protein eta</i>	UR	UR	DR
P61983	<i>14-3-3 protein gamma</i>	UR	UR	DR
P68255	<i>14-3-3 protein theta</i>	UR	UR	DR
P63102	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	UR	UR	DR
P52759	<i>2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase</i>	NI	UR	UR
P29266	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P13437	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase_ mitochondrial</i>	I	DR	NI
P17764	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial</i>	I	DR	I
Q9ER34	<i>Aconitate hydratase_ mitochondrial</i>	I	DR	NI
P68035	<i>Actin_ alpha cardiac muscle 1</i>	UR	DR	DR
P68136	<i>Actin_ alpha skeletal muscle</i>	DR	DR	DR
P62738	<i>Actin_ aortic smooth muscle</i>	UR	DR	DR
P60711	<i>Actin_ cytoplasmic 1</i>	DR	DR	DR
P63259	<i>Actin_ cytoplasmic 2</i>	UR	DR	DR
P63269	<i>Actin_ gamma-enteric smooth muscle</i>	UR	DR	DR

P11030	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	NI	UR	I
P39069	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	I	DR	I
Q05962	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	DR	DR	UR
Q09073	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	DR	DR	UR
Q62848	<i>ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1</i>	I	NI	UR
P02770	<i>Albumin</i>	UR	DR	I
Q9Z1P2	<i>Alpha-actinin-1</i>	DR	DR	NI
Q9QXQ0	<i>Alpha-actinin-4</i>	I	DR	NI
P23928	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	UR	DR	DR
P04764	<i>Alpha-enolase</i>	DR	DR	UR
P23565	<i>Alpha-internexin</i>	I	I	NI
Q5XIC8	<i>Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 3</i>	NI	UR	DR
P37377	<i>Alpha-synuclein</i>	UR	NI	NI
Q07936	<i>Annexin A2</i>	UR	NI	NI
P48037	<i>Annexin A6</i>	UR	UR	DR
P02651	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	UR	NI	NI
P13221	<i>Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic</i>	I	DR	UR
P00507	<i>Aspartate aminotransferase_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P19511	<i>ATP synthase F(0) complex subunit B1_ mitochondrial</i>	DR	UR	UR
P15999	<i>ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial</i>	NI	DR	UR
P10719	<i>ATP synthase subunit beta_ mitochondrial</i>	DR	DR	UR

P31399	<i>ATP synthase subunit d_ mitochondrial</i>	I	DR	UR
P29419	<i>ATP synthase subunit e_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q6PDU7	<i>ATP synthase subunit g_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q06647	<i>ATP synthase subunit O_ mitochondrial</i>	I	DR	UR
P21571	<i>ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial</i>	I	I	I
P47858	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ muscle type</i>	DR	DR	NI
B2RYE5	<i>Band 4.1-like protein 4B</i>	UR	NI	NI
P15429	<i>Beta-enolase</i>	DR	DR	I
Q63754	<i>Beta-synuclein</i>	NI	UR	DR
Q499P3	<i>C1GALT1-specific chaperone 1</i>	NI	NI	UR
Q811Q0	<i>Calcium-activated potassium channel subunit beta-2</i>	DR	DR	NI
P0DP29	<i>Calmodulin-1</i>	NI	NI	UR
P0DP30	<i>Calmodulin-2</i>	NI	NI	UR
P0DP31	<i>Calmodulin-3</i>	NI	NI	UR
P19633	<i>Calsequestrin-1</i>	DR	DR	I
P51868	<i>Calsequestrin-2</i>	NI	UR	DE
Q9JK25	<i>CAP-Gly domain-containing linker protein 1</i>	DR	DR	NI
P14141	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	DR	DR	DR
Q63086	<i>Cardiotrophin-1</i>	UR	NI	NI
Q06486	<i>Casein kinase I isoform delta</i>	NI	NI	UR
Q8R1R5	<i>CD99 antigen-like protein 2</i>	NI	NI	UR

Q8VHF5	<i>Citrate synthase_ mitochondrial</i>	DR	DR	UR
Q5PQJ9	<i>Coiled-coil domain-containing protein 175</i>	UR	NI	NI
P02454	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	NI	UR	DR
Q9WUW3	<i>Complement factor I</i>	DR	DR	NI
Q0V8T6	<i>Contactin-associated protein like 5-1</i>	UR	NI	NI
P00564	<i>Creatine kinase M-type</i>	DR	DR	I
P09605	<i>Creatine kinase S-type_ mitochondrial</i>	DR	DR	DR
P25809	<i>Creatine kinase U-type_ mitochondrial</i>	DR	DR	DR
P50463	<i>Cysteine and glycine-rich protein 3</i>	DR	I	DR
Q68FY0	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial</i>	UR	DR	UR
P32551	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2_ mitochondrial</i>	I	I	I
P20788	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial</i>	NI	UR	I
P00406	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	DR	DR	UR
P10888	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P11240	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial</i>	I	I	UR
P12075	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5B_ mitochondrial</i>	NI	UR	I
P62898	<i>Cytochrome c_ somatic</i>	DR	DR	DR
P48675	<i>Desmin</i>	UR	DR	UR
Q5PQQ6	<i>Dynein regulatory complex protein 9</i>	NI	UR	DR
P13803	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q68FU3	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	UR	NI	NI

P62630	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	I	DR	I
P62632	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	I	DR	I
P06761	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	NI	UR	DR
P14604	<i>Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
Q6AZ60	<i>Epidermal growth factor-like protein 7</i>	UR	NI	NI
Q5U1W7	<i>ER membrane protein complex subunit 9</i>	NI	UR	DR
P56571	<i>ES1 protein homolog_ mitochondrial</i>	NI	UP	DR
Q5U2Q7	<i>Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1</i>	NI	UR	DR
P07483	<i>Fatty acid-binding protein_ heart</i>	DR	I	I
P02693	<i>Fatty acid-binding protein_ intestinal</i>	DR	I	I
P50609	<i>Fibromodulin</i>	DR	DR	DR
D3ZHA0	<i>Filamin-C</i>	UR	DR	NI
Q9WUH4	<i>Four and a half LIM domains protein 1</i>	DR	DR	NI
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	DR	DR	UR
P09117	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	DR	DR	UR
P07323	<i>Gamma-enolase</i>	DR	DR	I
Q6P6V0	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	I	I	DR
P08009	<i>Glutathione S-transferase Mu 7</i>	NI	UR	DR
P04906	<i>Glutathione S-transferase P</i>	NI	UR	DR
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	DR	DR	I
Q9ESV6	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific</i>	DR	I	UR

A2RRU1	<i>Glycogen [starch] synthase_ muscle</i>	NI	UR	DR
P09811	<i>Glycogen phosphorylase_ liver form</i>	DR	I	DR
P09812	<i>Glycogen phosphorylase_ muscle form</i>	DR	DR	UR
Q04970	<i>GTPase NRas</i>	UR	UR	DR
P63095	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short</i>	NI	NI	UR
Q63803	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas</i>	NI	NI	UR
Q9R0A8	<i>HAUS augmin-like complex subunit 1</i>	NI	NI	UR
P0DMW0	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	NI	UR	DR
P0DMW1	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	UR	UR	DR
P55063	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	DR	DR	UR
Q8K3X8	<i>Heat shock factor-binding protein 1</i>	NI	NI	UR
Q5XHZ0	<i>Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial</i>	UR	NI	NI
P42930	<i>Heat shock protein beta-1</i>	UR	I	NI
P97541	<i>Heat shock protein beta-6</i>	UR	DR	I
P82995	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	UR	NI	NI
P34058	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	UR	UR	I
P01946	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/</i>	DR	DR	DR
P02091	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	DR	DR	DR
P11517	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	DR	NI	NI
P02262	<i>Histone H2A type 1</i>	I	NI	I
P0C169	<i>Histone H2A type 1-C</i>	I	NI	I

P0C170	<i>Histone H2A type 1-E</i>	I	NI	I
Q64598	<i>Histone H2A type 1-F</i>	I	NI	NI
P0CC09	<i>Histone H2A type 2-A</i>	I	DR	UR
Q4FZT6	<i>Histone H2A type 3</i>	I	NI	I
Q00728	<i>Histone H2A type 4</i>	I	NI	I
A9UMV8	<i>Histone H2A.J</i>	I	DR	UR
P0C0S7	<i>Histone H2A.Z</i>	DR	I	DR
Q00715	<i>Histone H2B type 1</i>	I	NI	NI
Q00729	<i>Histone H2B type 1-A</i>	I	DR	DR
P62804	<i>Histone H4</i>	NI	NI	I
Q9WVK7	<i>Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase_ mitochondrial</i>	NI	UR	I
Q4V8F9	<i>Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2</i>	NI	NI	UR
P56574	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
Q9ER30	<i>Kelch-like protein 41</i>	I	I	I
Q6IFU8	<i>Keratin_ type I cytoskeletal 17</i>	NI	UR	DR
Q4V8C9	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 56</i>	NI	UR	DR
P04642	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	I	DR	UR
P42123	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	I	DR	I
P15650	<i>Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial</i>	I	I	UR
P18163	<i>Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1</i>	NI	UR	DR
P51886	<i>Lumican</i>	NI	UR	DR

O88989	<i>Malate dehydrogenase_ cytoplasmic</i>	I	DR	UR
P04636	<i>Malate dehydrogenase_ mitochondrial</i>	DR	DR	UR
Q66H23	<i>Mitoferrin-1</i>	NI	UR	DR
O35217	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>	UR	NI	NI
Q9QZ76	<i>Myoglobin</i>	DR	DR	DR
P02600	<i>Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform</i>	DR	DR	I
P16409	<i>Myosin light chain 3</i>	I	DR	DR
P17209	<i>Myosin light chain 4</i>	NI	DR	DR
Q64119	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	DR	DR	DR
P04466	<i>Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform</i>	DR	DR	UR
P08733	<i>Myosin regulatory light chain 2_ ventricular/cardiac muscle isoform</i>	DR	DR	DR
Q9JLT0	<i>Myosin-10</i>	DR	DR	UR
P12847	<i>Myosin-3</i>	DR	DR	DR
Q29RW1	<i>Myosin-4</i>	DR	DR	DR
P02563	<i>Myosin-6</i>	DR	DR	DR
P02564	<i>Myosin-7</i>	DR	DR	DR
Q62812	<i>Myosin-9</i>	DR	DR	UR
Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10_ mitochondrial</i>	UR	UR	DR
P19234	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2_ mitochondrial</i>	UR	UR	I
Q66HF1	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_ mitochondrial</i>	UR	UR	I

P16884	<i>Neurofilament heavy polypeptide</i>	UR	I	I
P19527	<i>Neurofilament light polypeptide</i>	I	I	I
P12839	<i>Neurofilament medium polypeptide</i>	I	I	I
O09017	<i>Nuclear receptor subfamily 2 group F member 6</i>	DR	DR	NI
Q05982	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	UR	UR	I
P19804	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	UR	UR	I
P02631	<i>Oncomodulin</i>	NI	UR	DR
O88767	<i>Parkinson disease protein 7 homolog</i>	I	I	I
Q66HS7	<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	I	I	I
Q63716	<i>Peroxiredoxin-1</i>	UR	NI	NI
P35704	<i>Peroxiredoxin-2</i>	UR	UR	I
Q9Z0V5	<i>Peroxiredoxin-4</i>	UR	NI	UR
Q9R063	<i>Peroxiredoxin-5_ mitochondrial</i>	I	I	I
P97562	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2</i>	UR	UR	DR
P54777	<i>Peroxisome assembly factor 2</i>	DR	DR	NI
P16036	<i>Phosphate carrier protein_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P18424	<i>Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase</i>	UR	NI	NI
P31044	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	I	I	I
P07379	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase_ cytosolic [GTP]</i>	NI	UR	DR
P38652	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	NI	UR	DR
P16617	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	I	DR	UR

P16290	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	DR	DR	UR
P40307	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	NI	UR	DR
Q4QQR9	<i>Protein MEMO1</i>	NI	UR	DR
Q8VBU2	<i>Protein NDRG2</i>	DR	I	DR
Q66HR9	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 32</i>	DR	DR	NI
P35467	<i>Protein S100-A1</i>	NI	UR	DR
Q64536	<i>Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P49432	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial</i>	UR	UR	DR
P11980	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	I	DR	I
Q7TNY7	<i>Rab effector MyRIP</i>	NI	UR	DR
O70521	<i>Regulator of G-protein signaling 19</i>	NI	UR	DR
P81128	<i>Rho GTPase-activating protein 35</i>	NI	UR	DR
Q64578	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	DR	DR	NI
P11507	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>	DR	DR	NI
P18596	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3</i>	DR	DR	I
D4AE59	<i>Serine/threonine-protein kinase STK11</i>	NI	UR	DR
P12346	<i>Serotransferrin</i>	UR	NI	NI
P15651	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial</i>	UR	UR	DR
Q80W98	<i>Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta</i>	NI	UR	DR
Q920L2	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial</i>	UR	NI	NI

P21913	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial</i>	UR	NI	NI
P07632	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	I	I	I
P07895	<i>Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial</i>	NI	UR	DR
Q80WE1	<i>Synaptic functional regulator FMR1</i>	UR	NI	NI
Q9JI92	<i>Syntenin-1</i>	NI	NI	DR
Q9Z2K5	<i>Target of rapamycin complex subunit LST8</i>	UR	NI	NI
Q6P773	<i>TATA box-binding protein-associated factor_ RNA polymerase I_ subunit C</i>	DR	DR	NI
Q9JMG6	<i>TCF3 fusion partner homolog</i>	NI	UR	DR
Q68FQ0	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	UR	UR	DR
P46462	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	DR	DR	NI
Q64428	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial</i>	I	DR	I
Q60587	<i>Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial</i>	UR	DR	NI
P48500	<i>Triosephosphate isomerase</i>	DR	DR	UR
A0JPQ4	<i>Tripartite motif-containing protein 72</i>	I	DR	UR
P04692	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	DR	DR	DR
Q63610	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	DR	DR	DR
P09495	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	DR	DR	DR
P58775	<i>Tropomyosin beta chain</i>	I	DR	DR
P27768	<i>Troponin I_ fast skeletal muscle</i>	DR	DR	NI
P13413	<i>Troponin I_ slow skeletal muscle</i>	I	DR	I
P09739	<i>Troponin T_ fast skeletal muscle</i>	DR	DR	I

Q7TNB2	<i>Troponin T_ slow skeletal muscle</i>	NI	DR	DR
P68370	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	NI	I	UR
Q6P9V9	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	NI	I	I
Q6AYZ1	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	NI	NI	I
Q68FR8	<i>Tubulin alpha-3 chain</i>	NI	DR	UR
Q5XIF6	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	NI	NI	I
Q6AY56	<i>Tubulin alpha-8 chain</i>	NI	NI	I
P85108	<i>Tubulin beta-2A chain</i>	UR	NI	NI
Q3KRE8	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	I	NI	NI
Q4QRB4	<i>Tubulin beta-3 chain</i>	I	NI	I
Q6P9T8	<i>Tubulin beta-4B chain</i>	I	I	I
P69897	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	UR	I	NI
P35351	<i>Type-2 angiotensin II receptor</i>	NI	NI	UR
P45953	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P31000	<i>Vimentin</i>	I	NI	I
Q9Z2L0	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	I	DR	UR
Q8VHW8	<i>Voltage-dependent calcium channel gamma-5 subunit</i>	NI	UR	DR
P20289	<i>von Ebner gland protein 1</i>	NI	UR	DR
Q3MIF4	<i>Xylulose kinase</i>	UR	NI	NI

I: identificada porém sem valor significativo; NI: não identificado; DR: down-regulada; UR: up-regulada.

ANEXO 2. Padrão de expressão das 180 proteínas encontradas pelo MS/MS nas comparações CTxCS, RSxCS e RTxRS, no músculo PL.

ID UniprotKB	Protein name	CTxCS	RSxCS	RTxRS
Q5FVR4	<i>3'-5' exoribonuclease 1</i>	NI	NI	Ur
P46953	<i>3-hydroxyanthranilate 3_4-dioxygenase</i>	UR	NI	NI
Q9ER34	<i>Aconitate hydratase_ mitochondrial</i>	DR	I	UR
P68035	<i>Actin_ alpha cardiac muscle 1</i>	DR	UR	UR
P68136	<i>Actin_ alpha skeletal muscle</i>	DR	UR	UR
P62738	<i>Actin_ aortic smooth muscle</i>	DR	UR	UR
P60711	<i>Actin_ cytoplasmic 1</i>	DR	UR	UR
P63259	<i>Actin_ cytoplasmic 2</i>	DR	UR	I
P63269	<i>Actin_ gamma-enteric smooth muscle</i>	DR	UR	UR
P11030	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	UR	DR	UR
O70490	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P39069	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	I	I	UR
Q05962	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	NI	NI	UR
Q09073	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	DR	DR	UR
P02770	<i>Albumin</i>	I	I	UR
P07943	<i>Aldo-keto reductase family 1 member B1</i>	UR	NI	NI
Q9Z1P2	<i>Alpha-actinin-1</i>	DR	I	NI
Q9QXQ0	<i>Alpha-actinin-4</i>	DR	I	UR
P23928	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	UR	DR	NI

P04764	<i>Alpha-enolase</i>	DR	I	UR
P02651	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	DR	DR	NI
P13221	<i>Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic</i>	I	I	UR
P00507	<i>Aspartate aminotransferase_ mitochondrial</i>	I	DR	UR
P15999	<i>ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P10719	<i>ATP synthase subunit beta_ mitochondrial</i>	UR	DR	UR
P31399	<i>ATP synthase subunit d_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q6PDU7	<i>ATP synthase subunit g_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q06647	<i>ATP synthase subunit O_ mitochondrial</i>	I	I	UR
P21571	<i>ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial</i>	DR	I	DR
P15429	<i>Beta-enolase</i>	DR	UR	I
P13721	<i>Beta-galactoside alpha-2_6-sialyltransferase 1</i>	NI	UR	DR
Q7TNJ7	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1G</i>	DR	DR	NI
P0DP29	<i>Calmodulin-1</i>	DR	I	I
P0DP30	<i>Calmodulin-2</i>	I	I	I
P0DP31	<i>Calmodulin-3</i>	DR	I	I
P19633	<i>Calsequestrin-1</i>	DR	UR	NI
P14141	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	DR	DR	UR
Q4V7C8	<i>Centrosomal protein of 55 kDa</i>	UR	NI	NI
O54735	<i>cGMP-specific 3'_5'-cyclic phosphodiesterase</i>	UR	NI	NI
Q5BJT7	<i>Coiled-coil domain-containing protein 93</i>	DR	DR	NI

P02454	<i>Collagen alpha-1(I) chain</i>	DR	DR	NI
P00564	<i>Creatine kinase M-type</i>	DR	UR	I
P09605	<i>Creatine kinase S-type_ mitochondrial</i>	UR	I	UR
P25809	<i>Creatine kinase U-type_ mitochondrial</i>	I	I	NI
D3ZEF4	<i>Cullin-7</i>	DR	I	I
Q68FY0	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial</i>	DR	UR	I
P32551	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2_ mitochondrial</i>	DR	I	I
P20788	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P00406	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	DR	DR	UR
P10888	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P11240	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial</i>	I	DR	UR
P12075	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5B_ mitochondrial</i>	UR	NI	NI
P62898	<i>Cytochrome c_ somatic</i>	I	DR	UR
Q5BK18	<i>Cytosolic iron-sulfur assembly component 3</i>	NI	NI	UR
B2RYL1	<i>Decreased expression in renal and prostate cancer protein</i>	UR	NI	NI
P48675	<i>Desmin</i>	I	I	I
Q01205	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q66HG0	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF13</i>	NI	UR	DR
Q4KLN8	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF8</i>	NI	NI	UR
P62630	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	I	DR	I

P62632	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	DR	DR	UR
P52555	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	DR	DR	NI
B3EY83	<i>Epididymal-specific lipocalin-12</i>	NI	UR	DR
Q5U2Q7	<i>Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1</i>	DR	DR	NI
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	DR	UR	UR
P09117	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	DR	UR	UR
P07323	<i>Gamma-enolase</i>	I	UR	UR
Q6P6V0	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	DR	I	UR
P04906	<i>Glutathione S-transferase P</i>	DR	DR	NI
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	DR	UR	UR
Q9ESV6	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific</i>	DR	UR	UR
O35077	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]_ cytoplasmic</i>	DR	I	NI
A2RRU1	<i>Glycogen [starch] synthase_ muscle</i>	NI	NI	UR
P09811	<i>Glycogen phosphorylase_ liver form</i>	DR	UR	I
P09812	<i>Glycogen phosphorylase_ muscle form</i>	DR	UR	UR
Q04970	<i>GTPase NRas</i>	DR	DR	NI
P63018	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	DR	I	NI
P97541	<i>Heat shock protein beta-6</i>	NI	NI	UR
P14659	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	I	DR	NI
P01946	<i>Hemoglobin subunit alpha-1/2</i>	DE	DR	UR
P02091	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	UR	I	UR

P11517	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	I	I	UR
P02262	<i>Histone H2A type 1</i>	NI	I	NI
P0C169	<i>Histone H2A type 1-C</i>	NI	I	NI
P0C170	<i>Histone H2A type 1-E</i>	NI	I	NI
Q64598	<i>Histone H2A type 1-F</i>	NI	I	NI
P0CC09	<i>Histone H2A type 2-A</i>	DR	DR	NI
Q4FZT6	<i>Histone H2A type 3</i>	NI	I	NI
Q00728	<i>Histone H2A type 4</i>	NI	I	NI
A9UMV8	<i>Histone H2A.J</i>	DR	DR	NI
Q00715	<i>Histone H2B type 1</i>	DR	I	I
Q00729	<i>Histone H2B type 1-A</i>	DR	I	DR
P62804	<i>Histone H4</i>	DR	DR	NI
A6YP92	<i>Homeobox protein ARX</i>	NI	NI	UR
P97830	<i>Homeobox protein unc-4 homolog</i>	DR	DR	NI
Q62688	<i>Inactive phospholipase C-like protein 1</i>	I	I	DR
Q99NA5	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P41565	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1_ mitochondrial</i>	UR	NI	NI
P56574	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial</i>	I	DR	UR
Q6IFV3	<i>Keratin_ type I cytoskeletal 15</i>	NI	NI	UR
Q9JMH2	<i>Leucine-rich repeat_ immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1</i>	NI	NI	UR

P04642	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	DR	UR	UR
P42123	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	I	I	I
O88989	<i>Malate dehydrogenase_ cytoplasmic</i>	I	DR	UR
P04636	<i>Malate dehydrogenase_ mitochondrial</i>	I	I	UR
B1WBP0	<i>Metallophosphoesterase MPPED2</i>	UR	NI	NI
Q5U2R0	<i>Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta</i>	NI	UR	I
Q641X6	<i>MORN repeat-containing protein 1</i>	NI	NI	UR
Q9QZ76	<i>Myoglobin</i>	DR	DR	UR
P02600	<i>Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform</i>	DR	UR	I
P16409	<i>Myosin light chain 3</i>	UR	DR	UR
P17209	<i>Myosin light chain 4</i>	UR	UR	I
Q64119	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	I	UR	UR
P04466	<i>Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform</i>	DR	I	UR
P08733	<i>Myosin regulatory light chain 2_ ventricular/cardiac muscle isoform</i>	I	DR	UR
Q9JLT0	<i>Myosin-10</i>	I	UR	I
P12847	<i>Myosin-3</i>	DR	UR	UR
Q29RW1	<i>Myosin-4</i>	DR	UR	I
P02563	<i>Myosin-6</i>	DR	UR	UR
P02564	<i>Myosin-7</i>	DR	UR	UR
Q62812	<i>Myosin-9</i>	DR	UR	I
Q5BJY6	<i>N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase</i>	NI	NI	UR

Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P19234	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
Q66HF1	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_ mitochondrial</i>	NI	NI	UR
P19527	<i>Neurofilament light polypeptide</i>	DR	DR	NI
Q05982	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	NI	NI	UR
P19804	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	NI	NI	UR
O88767	<i>Parkinson disease protein 7 homolog</i>	DR	I	I
Q66HS7	<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	DR	I	I
Q62920	<i>PDZ and LIM domain protein 5</i>	NI	UR	I
Q9Z1Z9	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>	I	I	DR
Q5XI55	<i>Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase</i>	DR	DR	NI
P97562	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2</i>	DR	UR	DR
P31044	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	NI	NI	UR
P38652	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	NI	NI	I
P16617	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	DR	UR	UR
P25113	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	I	I	I
P16290	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	DR	UR	UR
Q99ML5	<i>Prenylcysteine oxidase</i>	DR	DR	NI
D3ZFB6	<i>Proline-rich transmembrane protein 2</i>	UR	NI	NI
Q8VBU2	<i>Protein NDRG2</i>	NI	NI	UR

Q5XIP1	<i>Protein pelota homolog</i>	UR	NI	NI
P61459	<i>Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase</i>	NI	NI	UR
Q64536	<i>Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P49432	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial</i>	I	I	I
P12928	<i>Pyruvate kinase PKLR</i>	DR	I	UR
P11980	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	DR	UR	UR
P51647	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	NI	NI	UR
Q80ZF7	<i>Retinol dehydrogenase 10</i>	NI	NI	UR
P81128	<i>Rho GTPase-activating protein 35</i>	NK	NI	DR
Q5XI59	<i>RING finger protein 10</i>	NI	UR	NI
Q64578	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	DR	DR	UR
P11507	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>	DR	UR	UR
P18596	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3</i>	DR	DR	NI
Q80WE1	<i>Synaptic functional regulator FMR1</i>	UR	NI	NI
Q68FQ0	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	I	DR	NI
Q9Z0V6	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial</i>	DR	DR	NI
P48500	<i>Triosephosphate isomerase</i>	DR	UR	UR
P04692	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	DR	DR	I
Q63610	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	DR	DR	UR
P09495	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	DR	DR	UR
P58775	<i>Tropomyosin beta chain</i>	DR	I	UR

P27768	<i>Troponin I_ fast skeletal muscle</i>	DR	I	UR
P09739	<i>Troponin T_ fast skeletal muscle</i>	NI	NI	UR
P68370	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	NI	NI	UR
Q6P9V9	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	NI	NI	UR
Q68FR8	<i>Tubulin alpha-3 chain</i>	NI	NI	UR
Q5XIF6	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	NI	NI	UR
Q6AY56	<i>Tubulin alpha-8 chain</i>	NI	NI	UR
P85108	<i>Tubulin beta-2A chain</i>	NI	NI	UR
Q3KRE8	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	NI	NI	UR
Q4QRB4	<i>Tubulin beta-3 chain</i>	NI	NI	UR
Q6P9T8	<i>Tubulin beta-4B chain</i>	DR	DR	UR
P69897	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	NI	NI	UR
P35351	<i>Type-2 angiotensin II receptor</i>	NI	NI	UR
P45953	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial</i>	DR	I	NI
P31000	<i>Vimentin</i>	DR	DR	NI
Q9Z2L0	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	DR	NI	I

I: identificada porém sem valor significativo; NI: não identificado; DR: down-regulada; UR: up-regulada.

Anexo 3. Classificação dos termos ontológicos e vias moleculares das 57 proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxC, RxC e RTxR no músculo SOL

Classificação	Termo	log10(corrected pValue)	Corrected pValue	Protein	Banco de dados
Cell cycle	Cell cycle	3.26	0.0006	Ywhaz Ywhaq Ywhah Ywhab Ywhag Ywhae	Reactome
	Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome	1.93	0.0118	Ywhag Ywhae	Reactome
	Loss of Nlp from mitotic centrosomes	1.93	0.0118	Ywhag Ywhae	Reactome
	AURKA Activation by TPX2	1.92	0.0122	Ywhag Ywhae	Reactome
	Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	1.84	0.0144	Ywhag Ywhae	Reactome
	Centrosome maturation	1.84	0.0144	Ywhag Ywhae	Reactome
	Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition	1.78	0.0166	Ywhag Ywhae	Reactome
	Recruitment of numa to mitotic centrosomes	1.70	0.0199	Ywhag Ywhae	Reactome
	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	1.64	0.0229	Ywhaz Ywhaq Ywhah Ywhab Ywhag Ywhae	Reactome

Cytoskeleton	<i>Postsynaptic actin cytoskeleton organization</i>	3.99	0.0001	Myh10 Actb Actg1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Actin filament organization</i>	3.26	0.0006	Actc1 Tpm4 Tpm3 Tpm1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Skeletal muscle thin filament assembly</i>	3.23	0.0006	Actc1 Acta1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Skeletal muscle tissue development</i>	2.77	0.0017	Ckmt2 Ckmt1 Mylpf	<i>GeneOntology</i>
	<i>Myofibril assembly</i>	2.71	0.0019	Myh10 Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>Actomyosin structure organization</i>	2.22	0.0061	Myh10 Actc1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Recycling pathway of L1</i>	2.14	0.0073	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>L1CAM interactions</i>	1.84	0.0144	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
				Des	<i>Uniprot*</i>
	<i>Gap junction degradation</i>	2.89	0.0013	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Formation of annular gap junctions</i>	2.89	0.0013	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Cell-extracellular matrix interactions</i>	2.80	0.0016	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Focal adhesion</i>	2.67	0.0021	Actb Myl2 Actg1 Mylpf	<i>Kegg</i>
	<i>Integrin signalling pathway</i>	2.39	0.0040	Actb Nras Actg1	<i>Panther</i>
	<i>Adherens junctions interactions</i>	2.22	0.0061	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Cell-cell junction organization</i>	2.14	0.0073	Actb Actg1	<i>Reactome</i>

<i>Cell communication</i>	<i>Gap junction trafficking</i>	2.04	0.0092	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Gap junction trafficking and regulation</i>	2.02	0.0096	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Rap1 signalling</i>	3.01	0.0010	Ywhab Ywhaz	<i>Reactome</i>
	<i>Cell junction organization</i>	1.88	0.0133	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>EPH-Ephrin signaling</i>	1.85	0.0142	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Cell-Cell communication</i>	1.70	0.0199	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Rap1 signaling pathway</i>	1.70	0.0201	Actb Nras Actg1	<i>Kegg</i>
	<i>Adherens junction</i>	1.64	0.0229	Actb Actg1	<i>Kegg</i>
<i>Muscular contraction</i>	<i>Protein localization to adherens junction</i>	1.54	0.0291	Actb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Positive regulation of atpase activity</i>	2.05	0.0089	Hspa1b Tpm1	<i>GeneOntology</i>
	<i>ATP metabolic process</i>	3.21	0.0006	Myh6 Tpm1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Muscle filament sliding</i>	3.34	0.0005	Myh3 Myh6 Hspa1b	<i>GeneOntology</i>
	<i>Skeletal muscle contraction</i>	2.20	0.0064	Myh6 Tpm1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway</i>	1.64	0.0229	Myh3 Myh6	<i>Panther</i>

	<i>Regulation of atpase activity</i>	3.07	0.0008	Myh10 Actg2 Actg1 Myh4 Actc1 Acta1 Actb Myh7	<i>GeneOntology</i>
	<i>Actin-mediated cell contraction</i>	1.54	0.0291	Actc1	<i>GeneOntology</i>
<i>Stress</i>	<i>Response to hydrogen peroxide</i>	3.94	0.0001	Hba1 Hbb Cryab Mb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Response to hypoxia</i>	3.08	0.0008	Aldoa Aldoc Cryab Pygm Mb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Attenuation phase</i>	2.80	0.0016	Hspa1b Hspa1l	<i>Reactome</i>
	<i>Hydrogen peroxide catabolic process</i>	2.41	0.0039	Hba1 Hbb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Cellular responses to stress</i>	2.33	0.0047	Hspa1b Hspa1l Cryab Ywhae	<i>Reactome</i>
	<i>Cellular oxidant detoxification</i>	1.56	0.0275	Hba1 Hbb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Negative regulation of hydrogen peroxide biosynthetic process</i>	1.54	0.0291	Cycs	<i>GeneOntology</i>
				Ca3	<i>Uniprot*</i>
	<i>Gene expression (Transcription)</i>	3.23	0.0006	Ywhaz Ywhaq Ywhah Ywhab Actb Ywhag Ywhae	<i>Reactome</i>
	<i>Generic transcription pathway</i>	3.08	0.0008	Ywhaz Ywhaq Ywhah Ywhab Ywhag Ywhae	<i>Reactome</i>

<i>Gene expression</i>	<i>Positive regulation of gene expression</i>	2.76	0.0017	Acta2 Acta1 Actg1 Actg2 Actc1 Hspa1b	<i>GeneOntology</i>
	<i>Signal transduction</i>	2.76	0.0018	Myh10 Ywhaz Actg1 Actb Ywhaq Nras Ywhah Ywhab Pdhhb Ywhag Ywhae	<i>Reactome</i>
	<i>Rna polymerase ii transcription</i>	2.75	0.0018	Ywhaz Ywhaq Ywhah Ywhab Ywhag Ywhae	<i>Reactome</i>
<i>Hormone</i>	<i>Oxytocin signaling pathway</i>	2.99	0.0010	Myl6 Actb Nras Actg1	<i>Kegg</i>
	<i>Estrogen signaling pathway</i>	2.18	0.0067	Hspa1b Nras Hspa1l	<i>Kegg</i>
	<i>HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)</i>	1.89	0.0130	Hspa1b Hspa1l	<i>Reactome</i>
	<i>Glucocorticoid receptor signaling pathway</i>	1.54	0.0291	Ywhah	<i>GeneOntology</i>
	<i>Arginine and proline metabolism</i>	1.88	0.0133	Ckmt2 Ckmt1	<i>Kegg</i>
	<i>ATP synthesis</i>	1.54	0.0291	Cybs	<i>Panther</i>
	<i>Fatty acid beta-oxidation</i>	1.93	0.0118	Acox2 Acads	<i>GeneOntology</i>
	<i>Glucose metabolic process</i>	1.72	0.0190	Pdhhb Tpi1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Citrate metabolic process</i>	1.54	0.0291	Cs	<i>GeneOntology</i>
	<i>Fatty acid beta-oxidation using acyl-coa oxidase</i>	1.54	0.0291	Acox2	<i>GeneOntology</i>

Metabolism	Fructose and mannose metabolism	3.39	0.0004	Aldoa Aldoc Tpi1	Kegg
	Fructose galactose metabolism	3.15	0.0007	Aldoa Aldoc	Panther
	Fructose 1,6-bisphosphate metabolic process	2.94	0.0011	Aldoa Aldoc	GeneOntology
	Carbohydrate metabolic process	2.41	0.0039	Cs Tpi1 Mdh2	GeneOntology
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.24	0.0058	Cs Mdh2	Kegg
	Tricarboxylic acid cycle	3.68	0.0002	Cs Pdhb Mdh2	GeneOntology
	Citrate cycle (TCA cycle)	3.58	0.0003	Cs Pdhb Mdh2	Kegg
	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	3.47	0.0003	Cs Pdhb Ndufa10 Mdh2	Reactome
	Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle	3.42	0.0004	Cs Pdhb Mdh2	Reactome
	Oxaloacetate metabolic process	2.89	0.0013	Cs Mdh2	GeneOntology
	Mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	2.80	0.0016	Cycs Uqcrc1	GeneOntology
				Cs Mdh2	Uniprot*
	Citric acid cycle (TCA cycle)	2.67	0.0021	Pdhb Pgam2 Pygm	Reactome
	Glucagon signaling pathway	2.40	0.0040	Tpi1 Pgam2	Kegg
	Gluconeogenesis	2.30	0.0050	Aldoa Aldoc	GeneOntology
	Pentose phosphate pathway	2.22	0.0061	Pdhb Mdh2	Kegg

	<i>Pyruvate metabolism</i>	2.07	0.0085	Atp5f1a Atp5f1b Mtco2 Eno1	<i>Kegg</i>
					<i>Uniprot*</i>
<i>Cell death</i>	<i>Apoptosis</i>	3.12	0.0008	Actb Nras Actg1 Cyts	<i>Kegg</i>
	<i>Negative regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway</i>	3.01	0.0010	Hspa1b Slc25a5	<i>GeneOntology</i>
	<i>Positive regulation of cell death</i>	2.89	0.0013	Acox2 Hba1 Hbb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Necroptosis</i>	2.00	0.0101	Pygm Slc25a5 Slc25a4	<i>Kegg</i>
	<i>Cellular senescence</i>	1.84	0.0144	Nras Slc25a5 Slc25a4	<i>Kegg</i>
	<i>Apoptosis signaling pathway</i>	1.54	0.0286	Hspa1b Cyts	<i>Panther</i>
	<i>Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process</i>	1.58	0.0263	Hspa1b Cryab	<i>GeneOntology</i>
	<i>RAF activation</i>	2.28	0.0053	Ywhab Nras	<i>Reactome</i>
	<i>Wnt signaling pathway</i>	3.97	0.0001	Myh4 Actc1 Acta1 Myh7 Actg2	<i>Panther</i>
	<i>HSF1-dependent transactivation</i>	3.95	0.0001	Hspa1b Cryab Hspa1l	<i>Reactome</i>
	<i>Response to mechanical stimulus</i>	3.50	0.0003	Hspa1b Actb Acta1 Actg1	<i>GeneOntology</i>
	<i>HIF-1 signaling pathway</i>	3.38	0.0004	Aldoa Eno1 Aldoc Pdhh	<i>Kegg</i>
	<i>Negative regulation of cell growth</i>	3.23	0.0006	Eno1 Cryab Mylpf Hspa1b	<i>GeneOntology</i>

Other terms	Morphogenesis of a polarized epithelium	3.16	0.0007	Hspa1b Hspa1l Ywhae Actb Actg1	Reactome
	In utero embryonic development	3.04	0.0009	Myh10 Eno1 Myh6 Hba1 Tpm1	GeneOntology
	Scavenging of heme from plasma	2.80	0.0016	Hba1 Hbb	Reactome
	Plasma membrane repair	2.76	0.0018	Myh10 Anxa6	GeneOntology
	RHO gtpases activate iqqaps	2.22	0.0061	Actb Actg1	Reactome
	Apelin signaling pathway	2.12	0.0075	Acta2 Nras Myl2	Kegg
	Regulation of cell shape	2.12	0.0076	Myh10 Aldoa Tpm1	GeneOntology
	Cellular responses to external stimuli	2.04	0.0091	Hspa1b Hspa1l Cryab Ywhae	Reactome
	Aging	2.01	0.0098	Cryab Aldoc Myh6 Slc25a4	GeneOntology
	Muscle organ development	1.99	0.0102	Cryab	GeneOntology
	Organelle biogenesis and maintenance	1.98	0.0105	Cct5 Ywhag Ywhae	Reactome
	Hemostasis	1.74	0.0182	Aldoa Ywhaz Nras Actg1	Reactome
				Fmod Myh9	Uniprot*
	Regative regulation of protein dephosphorylation	2.84	0.0014	Ywhab Ywhae	GeneOntology
	Protein refolding	2.76	0.0018	Hspa1b Hspa1l	GeneOntology

Protein processing	Cellular response to unfolded protein	2.51	0.0031	Hspa1b Hspa1l	GeneOntology
	Protein folding	2.44	0.0037	Hspa1b Cryab Cct5	GeneOntology
	Regulation of protein localization to plasma membrane	2.26	0.0055	Actb	GeneOntology
	Chaperone cofactor-dependent protein refolding	2.26	0.0055	Hspa1b Hspa1l	GeneOntology
	Response to unfolded protein	2.11	0.0078	Hspa1b Hspa1l	GeneOntology
	Regulation of mrna stability by proteins that bind AU-rich elements	3.76	0.0002	Ywhab Ywhaz Hspa1b	Reactome
	Protein processing in endoplasmic reticulum	1.98	0.0105	Hspa1b Cryab Hspa1l	Kegg
	Protein stabilization	1.89	0.0130	Hspa1b Cryab Cct5	GeneOntology
	Negative regulation of protein binding	1.58	0.0263	Actb Ckmt1	GeneOntology
	RAF/MAP kinase cascade	3.01	0.0010	Ywhab Actb Nras Actg1	Reactome
	MAPK1/MAPK3 signaling	2.98	0.0011	Ywhab Actb Nras Actg1	Reactome
	Flt3 signaling	2.92	0.0012	Ywhab Actb Nras Actg1	Reactome
	Cgmp-PKG signaling pathway	2.87	0.0013	Myh6 Myh7 Slc25a5 Slc25a4	Kegg
	MAPK family signaling cascades	2.84	0.0014	Ywhab Actb Nras Actg1	Reactome

<i>Kinases</i>	<i>Signaling by Hippo</i>	2.67	0.0021	Ywhab Ywhae	<i>Reactome</i>
	<i>Negative regulation of MAPK pathway</i>	2.33	0.0047	Ywhab Nras	<i>Reactome</i>
	<i>ERK1 and ERK2 cascade</i>	2.11	0.0078	Ywhaz Eno1	<i>GeneOntology</i>
	<i>PI3 kinase pathway</i>	2.09	0.0082	Ywhaz Nras	<i>Panther</i>
	<i>P38mapk events</i>	1.54	0.0291	Nras	<i>Reactome</i>
<i>Immune system/inflammatory processes</i>	<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	3.39	0.0004	Actb Myl2 Actg1 Mylpf	<i>Kegg</i>
	<i>Interaction between L1 and Ankyrins</i>	3.07	0.0008	Actb Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Innate immune system</i>	3.05	0.0009	Actg1 Nras Hbb Hspa1b Aldoa Actb Aldoc	<i>Reactome</i>
	<i>Signaling by Interleukins</i>	2.98	0.0011	Ywhab Ywhaz Actb Nras Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Immune system</i>	2.86	0.0014	Ywhaz Actg1 Hspa1b Nras Hbb Aldoa Ywhab Aldoc Actb	<i>Reactome</i>
	<i>Other interleukin signaling</i>	2.83	0.0015	Ywhab Actb Nras Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Cytokine Signaling in Immune system</i>	2.65	0.0022	Ywhab Ywhaz Actb Nras Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Neutrophil degranulation</i>	2.56	0.0028	Aldoa Hspa1b Aldoc Nras Hbb	<i>Reactome</i>
	<i>Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation</i>	1.96	0.0110	Actb Actg1	<i>Reactome</i>

Transport	Transport of nucleosides and free purine and pyrimidine bases across the plasma membrane	2.89	0.0013	Slc25a5 Slc25a4	Reactome
	O2/CO2 exchange in erythrocytes	2.84	0.0014	Hba1 Hbb	Reactome
	Erythrocytes take up carbon dioxide and release oxygen	2.84	0.0014	Hba1 Hbb	Reactome
	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	2.47	0.0034	Hba1 Hbb	Reactome
	Vesicle-mediated transport	2.33	0.0047	Hba1 Actb Hbb Actg1 Ywhae	Reactome
	Transport of small molecules	2.18	0.0067	Hba1 Slc25a4 Hbb Slc25a5 Mb	Reactome
	Transport of vitamins, nucleosides, and related molecules	2.11	0.0078	Slc25a5 Slc25a4	Reactome
	ATP transport	2.18	0.0067	Slc25a5 Slc25a4	GeneOntology
	Synaptic vesicle endocytosis	1.93	0.0118	Actb Actg1	GeneOntology
	Positive regulation of atpase-coupled calcium transmembrane transporter activity	1.54	0.0291	Hspa1b	GeneOntology
	Regulation of vacuole fusion, non-autophagic	1.54	0.0291	Eno1	GeneOntology
	Vegfa-vegfr2 pathway	2.83	0.0015	Actb Nras Actg1	Reactome
	Signaling by VEGF	2.76	0.0018	Actb Nras Actg1	Reactome

Vascular system	<i>Erythrocyte development</i>	2.26	0.0055	Hba1 Hbb	<i>GeneOntology</i>
	<i>VEGF signaling pathway</i>	1.99	0.0102	Cryab Nras	<i>Panther</i>
	<i>Platelet activation, signaling and aggregation</i>	1.72	0.0190	Aldoa Ywhaz Actg1	<i>Reactome</i>
	<i>Regulation of blood pressure</i>	1.75	0.0176	Acta2 Myh6	<i>GeneOntology</i>

Anexo 4. Classificação dos termos ontológicos e vias moleculares das 33 proteínas diferencialmente expressas (PDEs) comuns entre as comparações CTxC, RxC e RTxR no músculo PL

Classificação	Termo	log10(Corrected pValue)	Corrected pValue	Protein	Banco de dados
Cytoskeleton	<i>RHO gtpases activate iqqaps</i>	2.61	0.00	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>Recycling pathway of L1</i>	2.52	0.00	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>L1CAM interactions</i>	2.19	0.01	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>RHO gtpases Activate Formins</i>	1.75	0.02	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>Interaction between L1 and Ankyrins</i>	1.58	0.03	Actb	Reactome
	<i>Actin filamento organization</i>	2.86	0.00	Actc1 Tpm4 Tpm3	GeneOntology
	<i>Microtubule cytoskeleton organization</i>	1.60	0.02	Tubb4b Gapdh	GeneOntology
	<i>T-tubule organization</i>	1.58	0.03	Atp2a2	GeneOntology
	<i>Gap junction trafficking</i>	2.42	0.00	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>Gap junction trafficking and regulation</i>	2.40	0.00	Tubb4b Actb	Reactome
	<i>Tight junction</i>	1.52	0.03	Myh3 Actb	GeneOntology
	<i>Gap junction degradation</i>	1.51	0.03	Actb	Reactome

<i>Cell communication</i>	<i>Formation of annular gap junctions</i>	1.51	0.03	Actb	<i>Reactome</i>
	<i>Protein localization to adherens junction</i>	1.66	0.02	Actb	<i>GeneOntology</i>
	<i>Adherens junction assembly</i>	1.53	0.03	Actb	<i>GeneOntology</i>
<i>Muscular contraction</i>	<i>Actin filament-based movement</i>	3.07	0.00	Actc1 Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>Regulation of muscle contraction</i>	3.04	0.00	Atp2a1 Atp2a2	<i>GeneOntology</i>
	<i>Sarcomere organization</i>	2.44	0.00	Dbi Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>Muscle filament sliding</i>	1.66	0.02	Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>Regulation of striated muscle contraction</i>	1.66	0.02	Atp2a1	<i>GeneOntology</i>
	<i>Regulation of atpase activity</i>	1.58	0.03	Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>ATP metabolic process</i>	2.32	0.00	Myh3 Myh6	<i>GeneOntology</i>
	<i>Transition between fast and slow fiber</i>	3.38	0.00	Myh6 Atp2a2	<i>GeneOntology</i>
	<i>Actin-mediated cell contraction</i>	1.66	0.02	Actc1	<i>GeneOntology</i>

Stress	Response to hydrogen peroxide	1.92	0.01	Ldha Mb	GeneOntology
	Response to endoplasmic reticulum stress	1.85	0.01	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
				Ca3 Hba1	Uniprot*
Hormones	PPAR signaling pathway	1.88	0.01	Acox2 Dbi	Keeg
	Response to estrogen	1.70	0.02	Aldoa Ldha	GeneOntology
	Response to peptide hormone	1.62	0.02	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
Calcium ion	Calcium signaling pathway	2.37	0.00	Slc25a5 Atp2a2 Atp2a1	Keeg
	Sarcoplasmic reticulum calcium ion transport	3.71	0.00	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
	Cellular calcium ion homeostasis	3.06	0.00	Pygm Atp2a2 Atp2a1	GeneOntology
	Calcium ion transport	1.80	0.02	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
	Calcium ion transmembrane transport	1.66	0.02	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
	Positive regulation of atpase-coupled calcium transmembrane transporter activity	1.66	0.02	Atp2a1	GeneOntology

	Negative regulation of plasmic reticulum calcium ion concentration	1.56	0.03	Atp2a1	GeneOntology
	Positive regulation of mitochondrial calcium ion concentration	1.51	0.03	Atp2a1	GeneOntology
Metabolism	Glycolysis/gluconeogenesis	3.07	0.00	Gapdhs Gapdh Tpi1 Pgam2 Aldoa Aldoc Pkm Ldha Pgk1	Keeg
	Fructose galactose metabolism	3.60	0.00	Aldoa Aldoc	Phanter
	Pentose phosphate pathway	2.61	0.00	Aldoa Aldoc	Keeg
	Pyruvate metabolism	2.44	0.00	Ldha Pkm	Keeg
	Pyruvate metabolism	1.60	0.02	Pkm	Phanter
	Pyruvate metabolism	1.37	0.04	Ldha	Reactome
	Glycolytic process	3.07	0.00	Gapdhs Gapdh Tpi1 Pgam2 Aldoa Aldoc Pkm Pgk1	GeneOntology
	Glucose metabolic process	3.57	0.00	Tpi1 Gapdhs Pkm	GeneOntology
	Fructose 1,6-bisphosphate metabolic process	3.38	0.00	Aldoa Aldoc	GeneOntology
	Carbohydrate metabolic process	3.06	0.00	Tpi1 Gapdh Pgk1	GeneOntology
	ATP biosynthetic process	3.00	0.00	Aldoa Pkm	GeneOntology

	<i>Fatty acid beta-oxidation using acyl-coa oxidase</i>	1.66	0.02	Acox2	GeneOntology
	<i>Pyruvate biosynthetic process</i>	1.62	0.02	Pkm	GeneOntology
	<i>Negative regulation of fatty acid beta-oxidation</i>	1.62	0.02	Dbi	GeneOntology
	<i>NAD metabolic process</i>	1.60	0.02	Ldha	GeneOntology
	<i>Lactate metabolic process</i>	1.60	0.02	Ldha	GeneOntology
	<i>Glycogen catabolic process</i>	1.56	0.03	Pygm	GeneOntology
	<i>Positive regulation of oxidative phosphorylation</i>	1.56	0.03	Pgk1	GeneOntology
	<i>Fructose metabolic process</i>	1.53	0.03	Aldoa	GeneOntology
				Atp5f1b Mtco2	Uniprot*
<i>Cell death</i>	<i>Necroptosis</i>	1.54	0.03	Pygm Slc25a5	Keeg
	<i>Positive regulation of cell death</i>	2.06	0.01	Acox2 Eef1a2	GeneOntology
	<i>Negative regulation of chondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway</i>	1.56	0.03	Slc25a5	GeneOntology
				Hba1	Uniprot*

Other terms	Positive regulation of gene expression	3.08	0.00	Dbi Actc1 Acta2 Acta1 Actg2	GeneOntology
	Wnt signaling pathway	3.81	0.00	Actc1 Acta1 Myh7 Actg2	Phanter
	Eukaryotic translation elongation	1.66	0.02	Eef1a2	Reactome
	Hemostasis	1.62	0.02	Aldoa Tubb4b Atp2a2	Reactome
	HSF1 activation	1.58	0.03	Eef1a2	Reactome
	Response to camp	1.95	0.01	Ldha Pygm	GeneOntology
	Epithelial cell differentiation	1.94	0.01	Aldoc Pgk1	GeneOntology
	Animal organ regeneration	1.83	0.01	Aldoc Pkm	GeneOntology
	Aging	1.80	0.02	Aldoc Myh6 Eef1a2	GeneOntology
	Response to mechanical stimulus	1.71	0.02	Actb Acta1	GeneOntology
	Response to nutrient	1.62	0.02	Ldha Pkm	GeneOntology
	Positive regulation of cytoplasmic translation	1.60	0.02	Pkm	GeneOntology
	Morphogenesis of a polarized epithelium	1.60	0.02	Actb	GeneOntology
	Response to organic substance	1.56	0.03	Pygm Pkm	GeneOntology

	Negative regulation of receptor binding	1.56	0.03	Atp2a2	GeneOntology
	Cellular response to organonitrogen compound	1.56	0.03	Acta1	GeneOntology
	Regulation of blood pressure	2.10	0.01	Acta2 Myh6	GeneOntology
	Protein methylation	1.53	0.03	Eef1a2	Reactome
				H4c2	Uniprot*
Immune system/Inflammatory Process	Innate immune system	2.74	0.00	Aldoa Tubb4b Aldoc Eef1a2 Actb	Reactome
	Neutrophil degranulation	2.60	0.00	Aldoa Tubb4b Aldoc Eef1a2	Reactome
	Immune system	1.68	0.02	Aldoa Tubb4b Aldoc Eef1a2 Actb	Reactome
Transport	Transport of small molecules	1.53	0.03	Slc25a5 Atp2a2 Mb	Reactome
	Transport of nucleosides free purine and pyrimidine bases across the plasma membrane	1.51	0.03	Slc25a5	Reactome
	Proton transmembrane transport	1.74	0.02	Atp2a1 Atp2a2	GeneOntology
	Phosphatidylcholine acyl-chain remodeling	1.60	0.02	Dbi	GeneOntology

	<i>Regulation of transmembrane transporter activity</i>	1.58	0.03	Actb	<i>GeneOntology</i>
--	---	------	------	------	---------------------