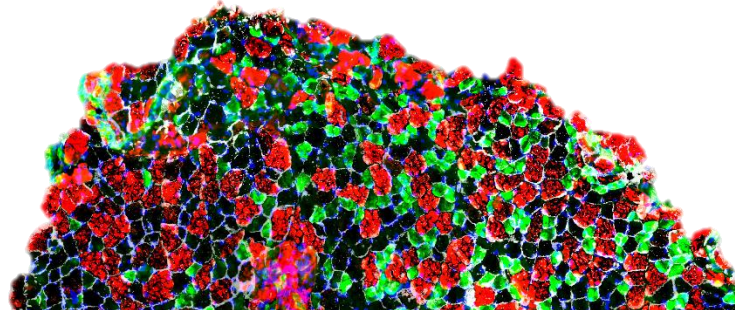
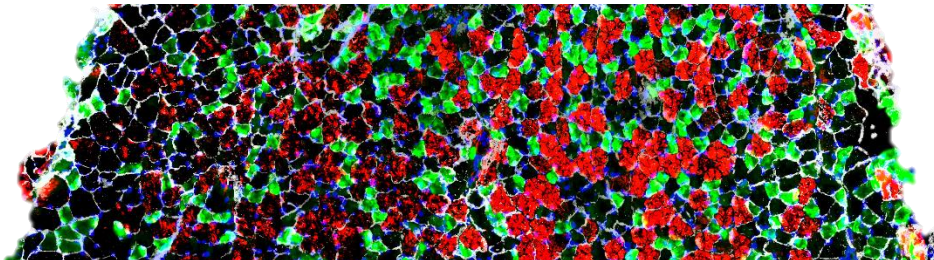




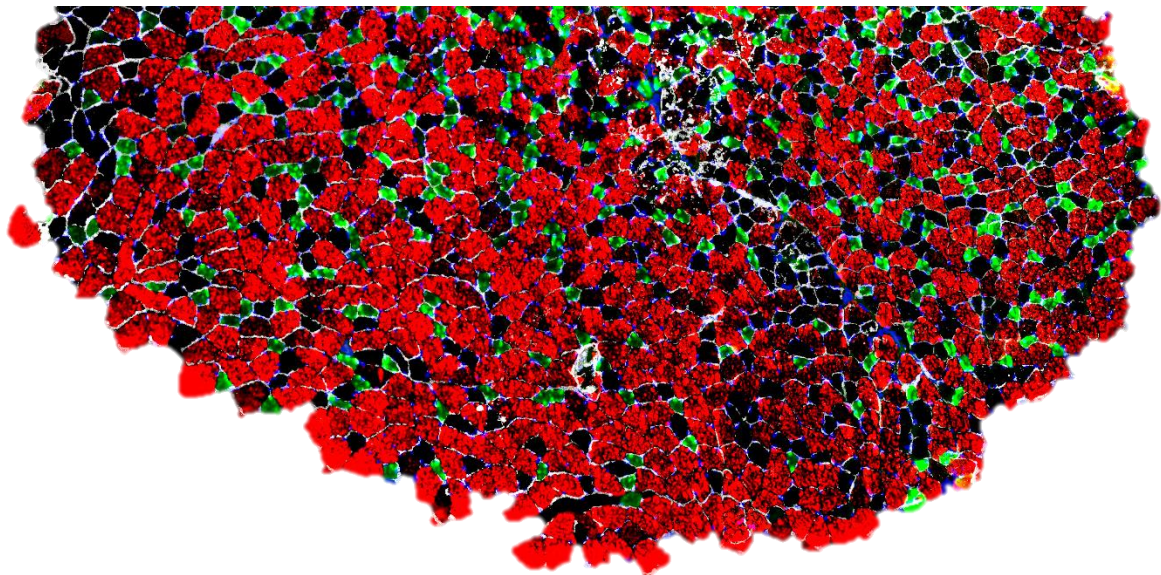
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA



NATANY GARCIA REIS



**Plasticidade muscular da prole de ratos machos e fêmeas em
resposta à deficiência materna de vitamina D: da atrofia à
hipertrofia muscular compensatória**



Ribeirão Preto- SP

2022

NATANY GARCIA REIS

**Plasticidade muscular da prole de ratos machos e fêmeas em resposta à
deficiência materna de vitamina D: da atrofia à hipertrofia muscular
compensatória**

Versão corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto- USP para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto- SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Natany Garcia

Plasticidade muscular da prole de ratos machos e fêmeas em resposta à deficiência materna de vitamina D: da atrofia à hipertrofia muscular compensatória/ Natany Garcia Reis; orientador, Luiz Carlos Carvalho Navegantes– 2022

127 f

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

1. Deficiência de vitamina D materna 2. Músculo esquelético 3. Programação fetal
4. Atrofia e hipertrofia muscular 5. Dimorfismo sexual

REIS, N. G. **Plasticidade muscular da prole de ratos machos e fêmeas em resposta à deficiência materna de vitamina D: da atrofia à hipertrofia muscular compensatória.** Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória ♥



*Aos meus pais Fatima e Ademir, à minha
vózinha Maria, à minha irmã Natália e ao
meu noivo Cláudio com amor e gratidão pelo
carinho e compreensão pelas minhas
ausências.*

Eu amo vocês! ♥

Agradecimentos



Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me dado força e coragem para continuar, mesmo quando a minha fé estava abalada. Obrigada também por ter cuidado e protegido àqueles que amo tanto, só assim eu pude concluir esse trabalho.

Aos meus pais **Fátima e Ademir** que nunca mediram esforços para que eu conseguisse ir atrás dos meus sonhos. Há 12 anos eu saí de casa e toda vez que eu retornava, vocês me acolhiam de braços abertos e com muito amor. A saudade doeu em vocês e doeu em mim, mas saber que estavam comigo em todos os momentos dessa jornada, me deu força para continuar. Obrigada por terem acreditado em mim e terem feito do meu sonho, o sonho de vocês. O amor de vocês me deu coragem e essa conquista é nossa. Eu amo vocês!

À **dona vovinha**, vulgo dona Mariazinha, pelo seu amor e carinho incondicional. Esse doutorado só saiu porque eu tinha o “tutu feito com amor” e aquele abraço gostoso me esperando sempre que eu voltava para casa. Eu te amo!

À **Natália**, minha querida irmã, que mesmo de muito longe sempre torceu por mim e sempre se alegra pelas minhas conquistas. Te amo e obrigada por estar comigo sempre!

Ao meu noivo **Cláudio** que esteve comigo desde a jornada da graduação até o doutorado. Obrigada por me ouvir, por ter me deixado chorar quando precisei, por acreditar em mim quando eu não acreditei e por todo o suporte, mesmo que fisicamente distante, ao longo de todos esses anos. Eu te amo!

Ao **Prof. Luiz**, a minha gratidão por não me deixar desistir. Eu sempre vou me lembrar daquele nosso café em que o senhor ouviu as minhas dúvidas e angústias quanto a continuar na pós-graduação e muito prontamente e com todo o carinho e respeito de sempre, me convidou para fazer parte da família LCM. Agradeço imensamente a oportunidade de crescimento pessoal e profissional que o senhor me deu. O senhor será sempre um grande exemplo de professor na minha vida. Obrigada por sempre acreditar em mim e ter me ensinado tanto!

À **Profa. Isis** por ter sido um grande exemplo de pesquisadora, professora e mãe. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório com tanto carinho. A senhora sempre terá a minha admiração. Obrigada!

Aos amigos **Ana Paula, Henrique, Aline e Natalia** por estarem presentes nos momentos mais difíceis. Era março de 2020, eu concluía meu segundo ano de doutorado e seguia para o terceiro. Estava na metade de um grande experimento que durou quase um ano e aí... o mundo parou. Sorte a minha que não tinha somente colegas de laboratório, mas sim grandes amigos. Eu não tenho palavras para descrever o quanto vocês foram e são importantes para mim. Eu não agradeço somente por terem me ajudado com todos os experimentos, eu agradeço por terem me dado suporte em um momento que eu não podia estar junto da minha família. Obrigada por ouvirem meus medos e frustrações e sempre terem um abraço cheio de carinho quando eu precisei. Eu levo vocês para a vida.

Ao **Dawit e Wilian** por terem me ensinado tanto. Vocês também são um grande exemplo de professores para mim. Obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar ao longo desses anos. Sou grata por toda a colaboração e amizade!

Aos meus queridos ICs **João Antônio, Matheus e Gustavo** por terem acreditado nesse trabalho e em mim. Eu aprendi a ensinar com e por vocês. Obrigada por terem me dado essa grande oportunidade.

Aos demais amigos do LCM (atuais ou não): **Letícia, Alexandre, Rafael, Diego e Gabriel**, obrigada pela convivência e pelos aprendizados. À **Karine**, pelas cantorias que alegravam o meu dia, por todos os ensinamentos e pelo carinho e amizade de sempre. Seguimos juntos meus amigos!

Aos técnicos que se tornaram grande amigos: **Elsa, Lilian, Neusa e Victor**. Graças ao apoio e suporte de vocês, esse doutorado pôde ser concluído com sucesso. Gostaria de fazer um agradecimento especial a Lilian que esteve comigo durante as muitas manhãs de esfregaços.

Você é uma querida, obrigada por tanto! À Neusa, que me ajudou tanto nos experimentos de síntese desde o início do doutorado, mas também durante a pandemia. Muito obrigada!

Ninguém faz pesquisa sozinho e aqui gostaria de agradecer a quem colaborou direta ou indiretamente para o sucesso desse trabalho. Ao **Dr. Francisco José** pelas discussões sempre muito pertinentes e pela ajuda com a dosagem do calcidiol juntamente com a **Marta Nakao**. Ao **Dr. José Simon** e a **Tania Beltramini** pela ajuda na dosagem do cálcio sérico. À **Dra Elen Miyabara** e seus alunos **Tatiane** e **Audrei** pelos experimentos de função muscular. Ao **Léo**, por toda a ajuda no biotério e a **Val** pelas dosagens de síntese. À **Profa Amanda Baviera** por ter me recebido em seu laboratório e a suas alunas que me ensinaram as técnicas de dosagem de sistemas proteolíticos. À **Josiane** pela ajuda nas dosagens do proteassoma.

À **Cláudia** e a **Elisa** por estarem sempre tão dispostas a me ajudar. Muito obrigada por todas as conversas na secretaria e pelo carinho de sempre!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo fomento ao projeto concluído (Processo FAPESP 2019/06517-1). Agradeço também ao apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq).

Epigrafe



“É mais fácil construir crianças fortes
do que reparar homens quebrados.”

Frederick Douglass

Resumo



RESUMO

REIS, N. G. **Plasticidade muscular da prole de ratos machos e fêmeas em resposta à deficiência materna de vitamina D: da atrofia à hipertrofia muscular compensatória.** 127f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O estágio fetal é uma janela crítica para o crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético, mas poucas informações estão disponíveis acerca do impacto da deficiência materna de vitamina D (Vit. D) (VDD) na estrutura e função da musculatura esquelética na prole e seus possíveis efeitos dimórficos sexuais. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da VDD materna, durante a gestação e a lactação, na morfologia, metabolismo e função contrátil de diferentes músculos esqueléticos da prole de ratos machos e fêmeas, na infância e vida adulta. Para isso, foram utilizadas ratas (*Wistar Hannover*) alimentadas com dieta controle (CTRL) (1000 UI de Vit. D3/kg de dieta), VDD (0 UI de Vit. D3) ou VDD+Ca (0 UI de Vit. D3+2 % de Ca+1,25 % de P/kg de dieta) por seis semanas e, durante os períodos de gestação e lactação. O grupo suplementado (VDD+Ca) foi incluído para se dissociar os efeitos da VDD das alterações do metabolismo do Ca^{+2} , no período infantil. No desmame (21 dias), filhotes machos (M) e fêmeas (F) foram separados nos seguintes grupos de acordo com a dieta materna: M-CTRL e F-CTRL; M-VDD e F-VDD e M-VDD-Ca e F-VDD-Ca e eutanasiados. Uma parte dos filhotes de ambos os sexos, CTRL e VDD, receberam dieta padrão até os 180 dias de idade. Aos 21 dias, M-VDD e M-VDD-Ca pesaram menos que M-CTRL e esse efeito foi associado com a redução sérica de calcidiol e de insulina, redução de adiposidade, atrofia muscular em *extensor digitorum longus* (EDL) e soleus, músculos de metabolismo glicolítico e oxidativo respectivamente, e hipoplasia em EDL. Nenhuma dessas alterações foi encontrada no grupo de fêmeas. Em EDL, a atrofia muscular do grupo M-VDD foi acompanhada pelo aumento do conteúdo e expressão de proteases dependentes de Ca^{+2} (calpaínas) e aumento de atrogina-1. A suplementação materna com Ca^{+2} não preveniu a atrofia e nem o aumento das calpaínas, mas ativou a PKC, aumentou o conteúdo de p25, um produto de clivagem das calpaínas, inativou a via de sinalização da insulina-IGF-1/Akt em EDL e, curiosamente, estimulou a síntese proteica em EDL e soleus da prole de machos. Nos grupos F-VDD e F-VDD-Ca também se observou aumento no conteúdo de calpaínas e redução de dois reguladores negativos da massa muscular (atrogina-1 e *miostatina*). Aos 180 dias, os animais apresentaram aumento da adiposidade, hiperinsulinemia e reversão da atrofia muscular induzida pela VDD na fase infantil, permanecendo apenas o efeito hipoplásico em EDL. Em

paralelo, verificou-se um aumento da área de secção transversa de fibras do tipo IIB, IIA e IIX e ativação do programa miogênico indicado pelo maior número de células satélites e maior conteúdo de MyoD e miogenina. Em estudos funcionais *ex vivo*, EDL do grupo M-VDD tornou-se mais resistente à fadiga e apresentou um aumento no estado de fosforilação do receptor de IGF-1/Insulina e seus alvos à jusante como a Ser⁴⁷³ Akt e Ser^{21/9} GSK-3β. Nesses músculos, a VDD materna induziu um aumento compensatório no conteúdo de calcitriol e CYP27B1, enzima que converte calcidiol em calcitriol. Grande parte dessas alterações não foi observada em soleus do grupo M-VDD, bem como em EDL e soleus da prole feminina. Em conjunto, esses dados mostram a importância da Vit. D materna no crescimento e desenvolvimento muscular da prole de ratos que varia de acordo com a idade, tipo de fibra e o sexo do animal. Além disso, indicam que as fibras glicolíticas deflagram mecanismos adaptativos à deficiência prolongada de Vit. D circulante.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina D materna; Músculo esquelético; Programação fetal; Atrofia e hipertrofia muscular; Dimorfismo sexual.

Abstract



ABSTRACT

REIS, N. G. **Muscle plasticity of male and female offspring rats in response to maternal vitamin D deficiency: from atrophy to compensatory muscle hypertrophy.** 127f. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The fetal stage is a critical window for skeletal muscle growth and development. However, little information is available about the impact of maternal vitamin D (Vit. D) deficiency (VDD) on the structure and function of skeletal muscle in offspring and its possible sexual dimorphic effects. Therefore, this work aimed to investigate the effects of maternal VDD, during pregnancy and lactation, on the morphology, metabolism, and contractile function of different skeletal muscles of male and female offspring rats, in childhood and adulthood. For this, rats (Wistar Hannover) were fed with a control diet (CTRL) (1000 UI of Vit. D₃/kg of diet), VDD (0 UI of Vit. D₃), or VDD+Ca (0 UI of Vit. D₃ +2% Ca+1.25% P/kg of diet) for six weeks and during the periods of gestation and lactation. The supplemented group (VDD+Ca) was included to dissociate the effects of VDD from alterations in Ca⁺² metabolism in the infant period. At weaning (21 days), male (M) and female (F) pups were separated into the following groups according to the maternal diet: M-CTRL and F-CTRL; M-VDD and F-VDD and M-VDD-Ca and F-VDD-Ca and euthanized. A part of the offspring of both sexes, CTRL and VDD, received a standard diet until 180 days. At 21 days, M-VDD and M-VDD-Ca weighed less than M-CTRL. This effect was associated with serum calcidiol and insulin reduction, adiposity reduction, muscle atrophy in extensor digitorum longus (EDL) and soleus, glycolytic and oxidative metabolism muscles, respectively, and hypoplasia in EDL. None of these changes were found in the female group. In EDL, muscle atrophy in the M-VDD group was accompanied by increased content and expression of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) and atrogin-1. Maternal supplementation with Ca²⁺ did not prevent atrophy or increase calpains, but activated PKC, increased p25 content, a calpain cleavage product, inactivated the Insulin-IGF-1/Akt signaling pathway in EDL, and, interestingly, stimulated protein synthesis in EDL and soleus from male offspring. In the F-VDD and F-VDD-Ca groups, an increase in calpain content and a reduction in two negative muscle mass regulators (atrogin-1 and myostatin) were also observed. At 180 days, the animals showed increased adiposity, hyperinsulinemia, and reversal of muscle atrophy induced by VDD in the infant phase, with only the hypoplastic effect on EDL remaining. In parallel, there was an increase in the cross-sectional area of type IIB, IIA, and IIX fibers and activation of the myogenic program indicated by the higher number of satellite cells and higher MyoD and myogenin content. In ex vivo functional studies, EDL from the M-

VDD group became more resistant to fatigue and showed an increase in the phosphorylation status of the IGF-1/Insulin receptor and its downstream targets such as Ser⁴⁷³ Akt and Ser^{21/9} GSK-3 β . In these muscles, maternal VDD induced a compensatory increase in calcitriol and CYP27B1 content, an enzyme that converts calcidiol to calcitriol. Most of these alterations were not observed in the soleus of the M-VDD group and EDL and soleus of female offspring. Taken together, these data show the importance of maternal Vit. D in the growth and muscle development of rats' offspring varies according to the animal's age, fiber type, and sex. Furthermore, they indicate that glycolytic fibers trigger adaptive mechanisms to prolonged VDD.

Keywords: Maternal vitamin D deficiency; Skeletal muscle; Fetal programming; Muscle atrophy and hypertrophy; Sexual dimorphism.

Sumário



SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1	Metabolismo e funções clássicas da vitamina D (Vit. D).....	23
1.2	A programação fetal e as respostas diferenciais aos insultos maternos entre machos e fêmeas	26
1.3	Metabolismo e funções não clássicas da Vit. D no músculo esquelético	27
1.4	O papel da Vit. D no controle do metabolismo de proteínas musculares.....	30
1.5	O desenvolvimento muscular e a regulação dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) pela Vit. D	32
1.6	A VDD materna e o desenvolvimento muscular esquelético da prole	34
2.	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivos gerais	38
2.2	Objetivos específicos	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	Animais	40
3.1.1	<i>Delineamento experimental</i>	40
3.2	Coleta de sangue e tecido	44
3.3	Dosagens hormonais e bioquímicas	44
3.4	Análises histológicas.....	45
3.5	Análise de proteínas por Western Blot.....	46
3.6	Quantificação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	48
3.7	Avaliação da síntese proteica muscular	49
3.7.1	<i>Avaliação da síntese proteica pela incorporação de tirosina marcada</i>	49
3.7.2	<i>Avaliação da síntese proteica in vivo pelo método SUnSET</i>	50
3.8	Avaliação da atividade <i>quimiotripsina-like</i> do proteossoma.....	51
3.9	Avaliação da função muscular <i>in vivo</i>	52
3.10	Análise estatística	53
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Resultados referentes às ratas mães	55
4.1.1	<i>Padronização do modelo experimental</i>	55
4.1.2	<i>Alterações do processo reprodutivo nas ratas mães</i>	57

4.1.3	<i>Mortalidade materna e fetal e número de filhotes por rata</i>	58
4.2	Resultados dos filhotes de 21 dias	59
4.2.1	<i>Parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais na prole de 21 dias</i>	59
4.2.2	<i>Fenótipo muscular da prole aos 21 dias</i>	61
4.2.3	<i>Alterações do metabolismo de proteínas em músculos da prole de 21 dias</i>	66
4.2.4	<i>Vias de sinalizações relacionadas ao metabolismo de proteínas musculares da prole de 21 dias</i>	70
4.2.5	<i>Metabolismo local de Vit. D no músculo esquelético da prole aos 21 dias</i>	74
4.3	Resultados dos filhotes de 180 dias	75
4.3.1	<i>Parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais na prole de 180 dias</i>	75
4.3.2	<i>Fenótipo muscular da prole aos 180 dias</i>	77
4.3.3	<i>Alterações no número de CSs e da miogênese na prole de 180 dias</i>	80
4.3.4	<i>Alterações do metabolismo de proteínas em músculos da prole de 180 dias</i>	83
4.3.5	<i>Vias de sinalizações relacionadas ao metabolismo de proteínas musculares da prole de 180 dias</i>	84
4.3.6	<i>Função contrátil no músculo EDL e soleus da prole de ratos machos aos 180 dias</i>	86
4.3.7	<i>Metabolismo local de Vit. D no músculo esquelético da prole aos 180 dias</i>	88
5	DISCUSSÃO	91
5.1	Efeitos da VDD materna na prole infantil	93
5.2	Efeitos da VDD materna na prole adulta	99
5.3	O dimorfismo sexual nas respostas à VDD materna	104
6	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO A	127

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo e funções clássicas da vitamina D (Vit. D)

A Vit. D ativa, também conhecida como calcitriol, é um hormônio esteroide que desempenha um papel essencial na homeostase do cálcio (Ca^{+2}) e fosfato, assim como no desenvolvimento e manutenção óssea (DELUCA, 2004).

Nos seres humanos, apenas 10 % a 20 % da Vit. D necessária diariamente provém da dieta. As principais fontes dietéticas são a Vit. D3 (colecalfiferol, de origem animal) e a Vit. D2 (ergosterol, de origem vegetal). Os restantes 80 % a 90 % são sintetizados endogenamente pela exposição da pele à ação da radiação ultravioleta B (espectro de 280–320 nm) no 7-deidrocolesterol, um precursor que está presente na epiderme e que é convertido em pré-vitamina D ou pré-calciferol. Posteriormente, há uma isomerização química dependente da temperatura corporal e a pré-vitamina D é convertida, lenta e progressivamente, em Vit. D3. A Vit. D3 circula no sangue ligada à proteína carreadora à Vit. D (DBP) e sofre hidroxilação no fígado, no carbono 25, principalmente pela enzima CYP2R1 (25-hidroxilase) dando origem ao calcidiol (25(OH)D3). O complexo calcidiol-DBP é transportado ao rim, onde é hidroxilado no carbono 1 pela CYP27B1 (1- α -hidroxilase), formando o calcitriol (1,25(OH)2D3) (BIKLE, 2014). Embora a última conversão ocorra tipicamente no rim, a placenta também exibe expressão e atividade abundantes da CYP27B1 (ZEHNDER *et al.*, 2002), o que provavelmente indica uma importância funcional para o metabolismo placentário local da Vit. D, durante a gestação.

Entre os principais órgãos-alvo do calcitriol estão o intestino e os rins, integrantes do sistema de controle do metabolismo osteomineral. Nas células endoteliais do intestino, o calcitriol estimula a absorção ativa de Ca^{+2} por meio da expressão de proteínas envolvidas na captação (TRPV5 e TRPV6), transporte intracelular (calbindina) e extrusão do Ca^{+2} para o

fluido extracelular. No jejuno, esse hormônio estimula a expressão de paracelinas, proteínas que formam canais por onde o Ca^{+2} é transferido passivamente por gradiente de concentração para o interior celular (HOENDEROP; NILIUS; BINDELS, 2005). Já o controle da absorção intestinal de fosfato envolve uma complexa regulação da expressão do fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) e da proteína cotransportadora de sódio e fosfato tipo 2b (NaPi2b) presente na membrana apical dos enterócitos do duodeno e jejuno (SHIMADA *et al.*, 2004). Nos rins, o calcitriol atua nos túbulos distais promovendo a reabsorção do Ca^{+2} filtrado (TRPV5 e CaBP-9k) e do fosfato. Ainda, regula a expressão e síntese de FGF-23 nos osteoblastos e osteócitos, de modo a manter níveis de Ca^{+2} e fósforo adequados para a mineralização óssea (BOUILLON *et al.*, 2008).

A descoberta do receptor de Vit. D (VDR), um fator de transcrição da família de receptores nucleares (HAUSSLER; NORMAN, 1969), e a confirmação de sua presença em vários tecidos não relacionados ao metabolismo ósseo e mineral, associou a deficiência de Vit. D (VDD) à patogenia de muitas doenças e distúrbios, tais como: obesidade, diabetes mellitus tipo II (MCGILL *et al.*, 2008), sarcopenia (SELDEEN *et al.*, 2018), risco cardiovascular (KUNADIAN *et al.*, 2014), alzheimer (LITTLEJOHNS *et al.*, 2014) e câncer (GARLAND *et al.*, 2006). A diversidade das ações da Vit. D pode ser evidenciada pelo fato desse hormônio possuir mais de 900 genes-alvos, correspondendo a cerca de 3% do genoma humano (WANG *et al.*, 2005).

Os efeitos biológicos do calcitriol são mediados, na sua grande maioria, pelo seu acoplamento citosólico ao domínio de ligação do VDR, o que induz uma alteração conformacional no receptor e a sua dimerização com os receptores retinóides X (RXR). Esse heterodímero formado acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada VDRE (*vitamin D response element*) levando à transcrição gênica e consequente

resposta biológica (RACHEZ; FREEDMAN, 2000). O VDR também apresenta respostas não genômicas mediadas por meio da ativação de receptores de membrana do tipo tirosina-quinase ou associados à proteína G (FLEET, 2004; **Figura 1**).

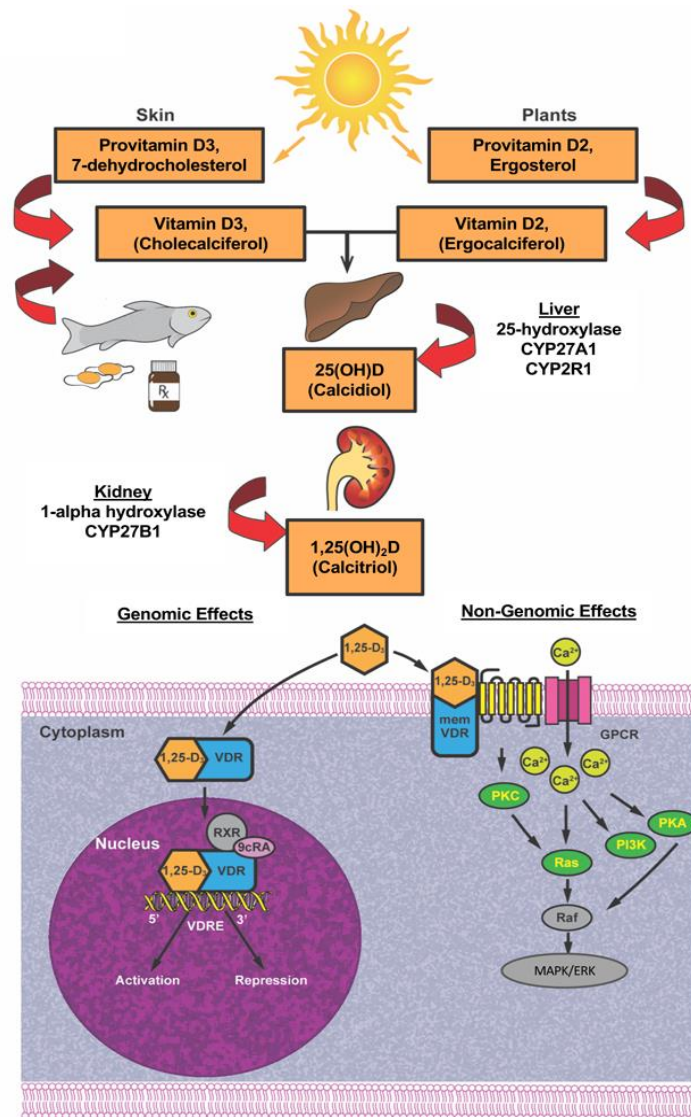


Figura 1: Síntese e transdução do sinal do metabólito hormonal ativo da Vit. D [1,25(OH)₂D₃]. Como mostrado, o fígado é essencial para converter a pré-vitamina D em 25(OH)D₃, o qual segue para o rim e outros tecidos menos estudados e é metabolizado em 1,25(OH)₂D₃. Uma vez formada, a 1,25(OH)₂D₃ pode induzir efeitos genômicos e não genômicos mediados por VDR. RXR: receptor de retinoide X; 9cRA: ácido 9-cis-retinoico; mem VDR: ligação de esteroide de resposta rápida associada à membrana; GPCR: receptor acoplado a proteína G. (Figura retirada de IDERAABDULLAH *et al.*, 2019).

1.2 A programação fetal e as respostas diferenciais aos insultos maternos entre machos e fêmeas

A programação fetal é uma teoria emergente que associa os processos adaptativos do feto às condições ambientais, durante a gestação, as quais podem ter efeitos em longo prazo no estado de saúde do indivíduo adulto (REICHETZEDER *et al.*, 2014). Sabe-se, por exemplo, que a desnutrição intrauterina afeta o crescimento dos órgãos e o desenvolvimento dos sistemas hormonais que podem, conseqüentemente, programar doenças a longo prazo (DESAI; HALES, 1997).

Os efeitos do estado nutricional da mãe para a filho são discutidos há muitos anos, e vários estudos têm considerado a nutrição materna como um fator epigenético ambiental que pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento fetal (HSU; TAIN, 2019). A epigenética é o estudo de alterações hereditárias no potencial de expressão gênica que não são causados por mudanças nas sequências de DNA (JAENISCH; BIRD, 2003). Durante o desenvolvimento, mudanças dinâmicas em marcadores epigenéticos como metilação de DNA, modificações covalentes pós-traducionais (por exemplo, adição de grupos metil ou acetil a resíduos de histona) e RNAs não codificadores regulam a atividade transcricional de genes conforme as células adquirem funções específicas (IDERAABDULLAH *et al.*, 2019). Embora as marcas epigenéticas sejam variáveis ao longo do desenvolvimento, um subconjunto de estados epigenéticos é programado desde o início e é mantido de forma estável na idade adulta, regulando funções celulares essenciais como o metabolismo, sobrevivência, proliferação e atividade celular (HEMBERGER; DEAN; REIK, 2009). A desregulação ambiental que leva à incapacidade de estabelecer ou manter esses programas epigenéticos estáveis, tem implicações significativas para os resultados de saúde de longo prazo (CHEN, T. *et al.*, 2016; MARTINEZ; GAY; ZHANG, 2015).

Pesquisas em desenvolvimento mostram que o *status* materno de Vit. D pode determinar o estado epigenético da prole. Entretanto, pouco se sabe sobre as repercussões fenotípicas dessa desregulação ao longo da vida do indivíduo (IDERAABDULLAH *et al.*, 2019). Essas alterações na placenta/embrião/feto fornecem uma explicação plausível para o conceito da origem fetal das doenças no adulto e que fundamenta o que hoje é conhecido como DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença) (MCMILLEN *et al.*, 2008).

As diferenças biológicas entre os sexos são aparentes desde o início da gravidez. Placentas de fetos masculinos e femininos têm diferentes proteínas e expressões gênicas, especialmente em condições adversas (ALUR, 2019). Mesmo dentro do meio intrauterino, o mesmo micro-RNA extracelular pode apresentar regulação positiva em mulheres e regulação negativa em fetos masculinos (RODOSTHENOUS *et al.*, 2017). Há evidências crescentes de que o sobrepeso ou obesidade materna pré-gravídica está diretamente associado ao maior risco de obesidade em crianças do sexo masculino, mas não do sexo feminino, durante o primeiro ano de vida (BRIDGMAN *et al.*, 2018). Observa-se que a exposição ao diabetes gestacional é fator de risco para o sobrepeso infantil em meninos, mas não em meninas (LE MOULLEC *et al.*, 2018). Portanto, fetos masculinos e femininos respondem de maneiras diferentes ao mesmo ambiente intrauterino e isso sugere uma variação biológica fundamental, muito provavelmente resultante de modificações celulares e moleculares ao longo da evolução das espécies (ALUR, 2019).

1.3 Metabolismo e funções não clássicas da Vit. D no músculo esquelético

A musculatura esquelética é constituída por diferentes tipos de fibras que possuem características fisiológicas e bioquímicas distintas. Existem duas categorias principais de fibras musculares nos vertebrados: fibras de contração rápida (também chamadas de tipo IIA e IIB) e fibras de contração lenta (tipo I). Os músculos com predominância de fibras lentas são também

chamados de “vermelhos” porque são densamente capilarizados e ricos em mioglobina e mitocôndrias. Por outro lado, os músculos de contração rápida são também chamados de “brancos” porque têm, comparativamente, menos mitocôndrias e mioglobina. As fibras brancas são mais adaptadas ao metabolismo glicolítico e, portanto, mais adequadas para desenvolver atividade muscular intensa e de curta duração (contração rápida), já que fadigam rapidamente. Por outro lado, as fibras vermelhas satisfazem suas demandas metabólicas por meio da fosforilação oxidativa, o que as tornam muito eficazes na manutenção postural e na atividade muscular mantida ao longo do tempo (contração lenta) (BERNE & LEVY, 2010).

A identificação do VDR na fibra muscular (SIMPSON; THOMAS; ARNOLD, 1985) mostrou que o músculo esquelético não é apenas um alvo direto da Vit. D e seus metabólitos, mas também é capaz de metabolizar calcidiol e calcitriol (VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2016). Foi demonstrado que os núcleos de mioblastos e miotubos humanos isolados expressam VDR funcional e que tais receptores variam de expressão ao longo dos diferentes estágios de maturação, idade e metodologia de detecção (GIRGIS *et al.*, 2014; OLSSON *et al.*, 2016). Também há evidências de que o VDR resida, preferencialmente, em uma população de células específicas no músculo esquelético como as células satélites (CSs; GIRGIS *et al.*, 2014). Apesar de não existir demonstração da maior densidade de VDR em fibras glicolíticas, sabe-se que indivíduos com VDD demonstram atrofia específica das fibras musculares do tipo II, resultando em respostas de contração rápida prejudicadas e um risco subsequente maior de desequilíbrio de postura e quedas (SATO *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* mostraram que a célula muscular também possui receptores de megalina e cubulina, proteínas responsáveis pelo transporte de DBP do fluido extracelular para o citoplasma celular (ABBOUD *et al.*, 2013). Uma vez internalizado, DBP pode se ligar à actina no complexo actomiosina ou na actina dispersa pelo citoplasma (HADDAD, 1982; **Figura 2**).

Embora a megalina e a DBP também tenham sido encontradas em biópsias de músculo humano (BRENNAN-SPERANZA *et al.*, 2017), o significado fisiológico do metabolismo local de Vit. D no músculo esquelético ainda não está claro.

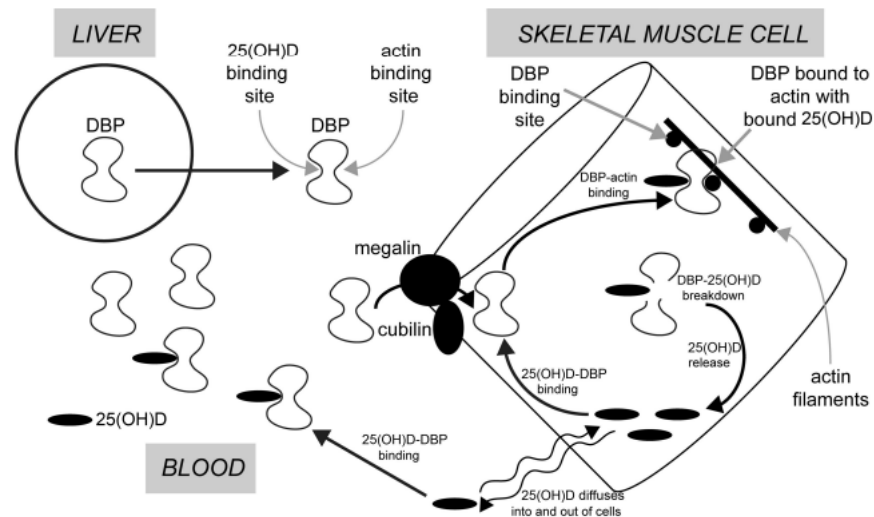


Figura 2: Desenho esquemático do mecanismo pelo qual a proteína carreadora de Vit. D (DBP) no sangue pode ser internalizada no músculo esquelético para fornecer locais de ligação intracelular de alta afinidade para a 25(OH)D3. É postulado que esta DBP intracelular permita que a 25(OH)D3, que se difunde nas células musculares, seja ligada e retida até que a DBP sofra proteólise. A 25(OH)D3 liberada se difunde da célula e é imediatamente ligada à DBP extracelular retornando assim à circulação. (Figura retirada de MASON *et al.*, 2019).

A Vit. D desempenha um papel fundamental na função contrátil e metabólica do músculo esquelético. Sabe-se que este hormônio modula o transporte de Ca^{+2} e desta forma regula o tônus e a contração muscular (LI, J. *et al.*, 2018), afeta o metabolismo da glicose através dos seus efeitos indiretos estimulatórios na secreção de insulina (ZHOU, Q. G. *et al.*, 2008), regula a transcrição de fatores estimuladores de miócitos (OJUKA *et al.*, 2002; WRIGHT *et al.*, 2004), aumenta a síntese de proteínas *de novo* (BOLAND, 1986; SØRENSEN, O. H. *et al.*, 1979) e com isso promove crescimento muscular. Além disso, foi demonstrado que a Vit. D é capaz de aumentar a função das mitocôndrias no músculo por meio da ativação da respiração acoplada à geração de ATP mitocondrial (SUZUKI, T. *et al.*, 2008).

1.4 O papel da Vit. D no controle do metabolismo de proteínas musculares

O crescimento, por definição, implica em aumento de massa, o qual pode ocorrer por aumento no número de células (hiperplasia) ou por aumento do conteúdo proteico por célula (hipertrofia) (AIRES, 2013). O *turnover* de proteínas musculares é determinado pelas velocidades de síntese e degradação de proteínas, de tal forma que as alterações em um ou em ambos os processos, podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos da Vit. D na manutenção da massa muscular. Os três principais sistemas proteolíticos na musculatura esquelética são: lisossomal, dependente de Ca^{2+} e dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma.

O sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} é formado por proteases cisteínas denominadas de calpaínas. Há duas principais isoformas de calpaínas: micro-calpaína (calpaína 1) e mili-calpaína (calpaína 2), que embora possuam propriedades estruturais muito semelhantes, distinguem-se quanto à afinidade de ativação pelo íon Ca^{2+} (INOMATA *et al.*, 1983). As calpaínas estão normalmente presentes no citosol sob um estado inativo (SUZUKI, K. *et al.*, 1995) pela ação da calpastatina, um inibidor endógeno dessas proteases, e se tornam ativas em situações em que há uma perturbação na homeostase do Ca^{+2} citosólico levando ao aumento da proteólise muscular (TIDBALL; SPENCER, 2000). Esse sistema proteolítico apresenta funções intracelulares como no controle da proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose (COSTELLI *et al.*, 2005). As calpaínas também parecem exercer funções importantes na determinação da velocidade de renovação das proteínas miofibrilares. Há evidências de que as calpaínas estejam presentes na Linha Z do sarcômero mantendo a sua estrutura organizacional e, ao serem ativadas, favoreceriam a liberação e degradação das proteínas miofibrilares pelo proteassoma, um complexo proteolítico vital para as células (LOWELL; RUDERMAN; GOODMAN, 1986).

A degradação de proteínas musculares pelo sistema proteolítico dependente de Ub-proteassoma depende, inicialmente, que proteínas alvos de degradação sejam ligadas

covalentemente à Ub. Atualmente, sabe-se que o processo de ubiquitinação das proteínas é finamente regulado e depende da ação de três famílias de enzimas: a E1 ou enzima ativadora da Ub, a E2 ou enzima carreadora e a enzima E3 ou Ub-ligase. A E3 ligase é a limitante desse processo, uma vez que tem a capacidade de reconhecer, especificamente, os substratos proteicos a serem degradados e de ligá-los à Ub formando complexos poliubiquitinados (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Entre os diferentes tipos de Ub-ligasas conhecidas, as mais estudadas são a atrogina-1 (MAFbx [*Muscle Atrophy F-box*]) e a MuRF1 (*Muscle RING Finger 1*) (BODINE *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001). Essas proteínas são expressas exclusivamente no músculo esquelético e cardíaco e estão envolvidas em uma série de modificações transcricionais que precedem a perda de proteínas musculares descritas como “programa atrófico”.

Há evidências de que a VDD em ratos resultou em perda muscular com aumento da degradação de proteínas devido à hiperativação da via Ub-proteassoma. Nesse mesmo trabalho, a atividade da via dependente de Ca^{2+} também foi analisada, mas não houve alteração da mesma (BHAT, M. *et al.*, 2013). Um estudo recente relata que a insuficiência de Vit. D crônica induzida pela dieta por 12 meses, em camundongos, induz um fenótipo sarcopênico caracterizado por baixa capacidade anaeróbica, menor massa magra, redução da área transversal de fibras de contração rápida, assim como distúrbios da marcha e aumento da expressão gênica de atrogina-1 (SELDEEN *et al.*, 2018).

Além da inibição da proteólise, estudos mostram que a síntese proteica induzida por leucina e insulina em miotubos C2C12 é amplificada na presença de calcitriol (SALLES *et al.*, 2013). Evidências indicam ainda que a ação anabólica da Vit D no metabolismo proteico esteja associada à supressão da miostatina, uma proteína indutora de atrofia (GOPINATH, 2017).

Ainda que esse conjunto de resultados indique que a Vit. D pode exercer ações anti-catabólicas e anabólicas na musculatura esquelética de roedores, os efeitos decorrentes da VDD

materna sobre a massa muscular da prole jovem e adulta nunca foram consistentemente demonstrados.

1.5 O desenvolvimento muscular e a regulação dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) pela Vit. D

O desenvolvimento, por definição, implica em aquisição de funções, diferenciação dos tecidos e expressão de proteínas específicas que determinarão as características funcionais dos diferentes tecidos, processo que tem sua maior expressão no período embrionário (AIRES, 2013). A miogênese (**Figura 3**) é um processo de desenvolvimento embrionário do tecido muscular que se inicia com a proliferação e diferenciação de células progenitoras musculares (CSs), as quais se fundem para formar miofibras multinucleadas e, em seguida, se hipertrofiam por mecanismos moleculares distintos (FIOROTTO; DAVIS, 2018). O desenvolvimento do músculo esquelético dos vertebrados é regulado pelos MRFs, uma família de fatores de transcrição composta por quatro proteínas musculares específicas que incluem o fator determinante miogênico (MyoD), fator miogênico 5 (Myf5), miogenina (MyoG) e Myf6 (MRF4). Os MRFs controlam a determinação e diferenciação de células musculares esqueléticas, durante a embriogênese e a miogênese pós-natal (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

As CSs quiescentes expressam o fator de transcrição Pax7 e quando ativadas aumentam a expressão de MyoD, levando à proliferação de mioblastos (CHEN, W.; DATZKIW; RUDNICKI, 2020; DELL'ORSO *et al.*, 2019; EVANO; TAJBAKSHSH, 2018; GAYRAUD-MOREL; CHRÉTIEN; TAJBAKSHSH, 2009). No início da diferenciação de mioblastos, ocorre uma diminuição concomitante na expressão de Pax7 e aumento na expressão de miogenina (CHEN, W.; DATZKIW; RUDNICKI, 2020; DELL'ORSO *et al.*, 2019; EVANO; TAJBAKSHSH, 2018).

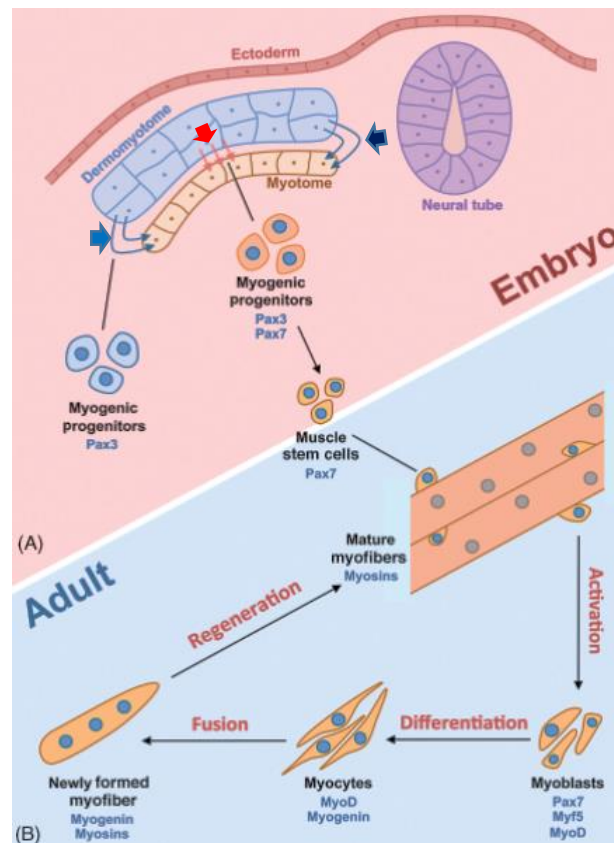


Figura 3: Representação esquemática da miogênese no período embrionário e durante a regeneração muscular. **(A)** O desenvolvimento muscular é iniciado no dermomiótomo e pode ser dividido em duas fases. Inicialmente, as células Pax3+ se separam das extremidades do dermomiótomo (setas azuis) e formam o miótomo. Em seguida (miogênese primária), as células Pax3+/Pax7+ migram da região central do dermomiótomo para completar a formação do músculo esquelético (setas vermelhas). Ao final do desenvolvimento fetal, um grupo de células Pax3+/Pax7+ dão origem às CSs. **(B)** As CSs estão localizadas sob a lâmina basal que envolve as miofibras. Após a lesão, as mesmas saem do estado de quiescência, são ativadas e assim dão origem aos mioblastos que se diferenciam em miócitos e se fundem para formar novas miofibras que levam à regeneração muscular. (Figura retirada de GIRARDI; LE GRAND, 2018).

O desenvolvimento muscular no feto é afetado diretamente por fatores nutricionais. Sabe-se que a restrição nutricional materna altera a expressão dos MRFs e reduz o número de fibras musculares no feto (FIOROTTO; DAVIS, 2018). Embora nesta situação catabólica, o tamanho das miofibras possa ser revertido, há um déficit permanente na massa muscular, uma vez que fibras adicionais não são geradas após a metade do tempo gestacional em humanos e após o nascimento em roedores (DU *et al.*, 2010; ONTELL; KOZEKA, 1984; WILSON; ROSS;

HARRIS, 1988). Os mecanismos exatos responsáveis pelo comprometimento desses eventos em resposta à falta de nutrientes e, mais especificamente, à VDD, durante a miogênese, ainda são incertos.

Como comentado, anteriormente, sabe-se que o conteúdo e expressão de VDR no músculo varia, significativamente, durante os vários estágios de diferenciação muscular. Estudos indicam que os músculos de camundongos recém-nascidos exibiram maior expressão de VDR do que aqueles com três semanas de idade. No entanto, quando camundongos adultos são expostos à lesão muscular ou exercício, há uma regulação positiva significativa de VDR nas fibras musculares em reparo (MAKANAE *et al.*, 2015; SRIKUEA *et al.*, 2012), sugerindo um papel pleiotrópico do VDR no músculo e potenciais efeitos na regulação miogênica. Estudos recentes reforçam esta hipótese ao identificar vários VDREs na região promotora do gene da miogenina (CAMPERI *et al.*, 2017), além de demonstrar o papel fundamental da Vit. D na expressão dos diferentes MRFs (BRAGA *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2011; OLSSON *et al.*, 2016).

1.6 A VDD materna e o desenvolvimento muscular esquelético da prole

A VDD materna leva a efeitos adversos no feto, como baixo peso ao nascimento (BODNAR *et al.*, 2010), atrasos no crescimento e ossificação (BOWYER *et al.*, 2009), diabetes mellitus tipo 1 (SØRENSEN, I. M. *et al.*, 2012) e esclerose múltipla (TORKILDSEN *et al.*, 2012). Estudos com ratos mostram ainda que a VDD materna leva a alterações da reatividade vascular (TARE *et al.*, 2011), assim como no desenvolvimento do sistema nervoso (EYLES *et al.*, 2003) e cardíaco-pulmonar na prole (GEZMISH *et al.*, 2010).

A descoberta de que o calcidiol materno em ratas é transportado através da placenta e acumulado no músculo esquelético da prole, indica que o músculo possa ter um papel funcional

na conservação desse metabólito em mamíferos (CLEMENTS; FRASER, 1988). Apesar das várias funções já conhecidas da Vit. D no músculo esquelético, poucos trabalhos relacionam o estado materno de Vit. D com o desenvolvimento muscular dos filhotes e nenhum estudou os efeitos a longo prazo da VDD materna no músculo da prole de forma comparativa entre machos e fêmeas.

O estudo de Hines et al. (2013), em porcos, mostrou que a suplementação materna de calcidiol aumentou o número de fibras no *longissimus dorsi* (LD) (HINES *et al.*, 2013). Em outro trabalho, a prole de porcas tratadas com dieta enriquecida com Vit. D apresentou aumento da área de secção transversa das fibras musculares do LD e do *psaos maior* (ZHOU, H. *et al.*, 2016). Em camundongos *knockout* (KO) para VDR, as fibras musculares (tipos I e II) de todos os músculos estriados foram significativamente menores quando comparadas a seus controles sugerindo um severo atraso no desenvolvimento muscular (ENDO *et al.*, 2003). Isso foi confirmado pela análise da expressão de marcadores do desenvolvimento muscular precoce (Myf5, E2A e miogenina) que ainda estavam presentes no músculo dos animais VDR-KO, após 3 semanas de idade, mas não nos animais controles. Além disso, as isoformas de cadeia pesada da miosina neonatal e embrionária permaneceram expressas por mais tempo no citoplasma de pequenas fibras musculares desses animais. Nesse mesmo trabalho, todos os fatores de transcrição miogênicos e as isoformas de cadeia pesada da miosina neonatal foram regulados negativamente pelo tratamento com calcitriol em células C2C12, indicando um efeito direto da Vit. D via VDR no processo de desenvolvimento normal do músculo esquelético (ENDO *et al.*, 2003).

Em conjunto, estes trabalhos indicam que a Vit. D é importante não apenas para a proliferação de células miogênicas, durante a embriogênese, mas também para o ganho de proteínas, durante o desenvolvimento pós-natal. Com base nestas evidências, a **hipótese que foi testada no presente trabalho é que a depleção de Vit. D, com ou sem suplementação de Ca^{2+}**

pelas mães, no período intrauterino e neonatal levasse a prejuízos no crescimento e desenvolvimento muscular, alterações da massa e do metabolismo de proteínas musculares na infância e na vida adulta dos ratos de ambos os sexos.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos da deficiência materna de Vit. D, durante a gestação e lactação, no crescimento e desenvolvimento da musculatura esquelética da prole de ratos machos e fêmeas, na infância e vida adulta.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o sucesso reprodutivo das mães e o perfil de crescimento, metabólico e hormonal da prole aos 21 e 180 dias de vida.
2. Dissociar o efeito da VDD das alterações do metabolismo do Ca^{+2} na morfologia e metabolismo do músculo esquelético da prole de 21 dias.
3. Avaliar as respostas dimórficas sexuais no modelo materno de VDD no crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético da prole de 21 e 180 dias.
4. Investigar as alterações fenotípicas das fibras musculares, a atividade miogênica e estabelecer possíveis diferenças entre músculos soleus (oxidativo) e EDL (glicolítico) da prole aos 21 e/ou 180 dias.
5. Correlacionar o fenótipo muscular com possíveis alterações do metabolismo de proteínas (síntese e degradação) e analisar as vias de sinalizações relacionadas aos processos de síntese e degradação em músculos da prole de 21 e 180 dias.
6. Investigar a função contrátil dos músculos soleus e EDL em animais de 180 dias.
7. Investigar o metabolismo local da Vit. D nos músculos da prole de 21 e 180 dias.

Material e métodos



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O protocolo experimental (52/2018; **ANEXO 1**) de uso de animais foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo (FMRP-USP) para que estivesse de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover*, machos de 120-140 g e fêmeas de 80-100 g, provenientes do Biotério Central da FMRP-USP. Os filhotes foram retirados das mães e eutanasiados aos 21 dias (fase infantil) ou mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP até os 180 dias (fase adulta), em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlada (22°C; 12 h claro/12 h escuro). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos em número de quatro por caixa.

3.1.1 Delineamento experimental

Após a chegada dos roedores no biotério do Departamento de Fisiologia, os machos foram mantidos com dieta Nuvilab (Nuvital, Quimtia), durante todo o período de acasalamento, enquanto que, durante seis semanas de adaptação e os períodos de gestação e lactação, as ratas receberam dieta AIN-93G padrão (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) ou dietas AIN-93G modificadas visando à obtenção de animais VDD sem e com suplementação de Ca⁺². As ratas foram randomicamente separadas nos seguintes grupos:

- **Controles (CTRL):** Ratas que receberam dieta **CTRL** (1000 UI de Vit. D3/kg de dieta AIN-93G), durante seis semanas de adaptação e os períodos de gestação e lactação, n=20;

- **Deficientes em Vit. D (VDD):** Ratas que receberam dieta **VDD** (0 UI de Vit. D3 de dieta AIN-93G modificada), durante seis semanas de adaptação e os períodos de gestação e lactação, n=40;
- **Deficientes em Vit. D e suplementadas com Ca²⁺ (VDD+Ca):** Ratas que receberam dieta **VDD+Ca** (0 UI de Vit. D3+2 % de Ca+ 1,25 % de P/kg de dieta AIN-93G modificada) durante seis semanas de adaptação e os períodos de gestação e lactação, n=40.

A escolha das dietas baseou-se em estudos anteriores da literatura (ALMEIDA *et al.*, 2019; STAVENUITER *et al.*, 2015) e as mesmas foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, SP). A composição detalhada de todas as dietas utilizadas está descrita na **Tabela 1**. A eficiência das dietas foi comprovada por meio da dosagem de calcidiol por quimioluminescência no soro das mães. Durante as seis semanas, as ratas foram pesadas e tiveram a glicemia dosada, semanalmente. Na quarta semana de dieta, um grupo separado de ratas foi colocado em gaiolas metabólicas, durante 24 h, para adaptação e, posteriormente, por mais 24 h para análise da ingestão de água e ração.

Tabela 1- Composição das dietas controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca²⁺ (VDD+Ca) oferecida as ratas antes e durante os períodos de gravidez e lactação

Nutriente (%)	Dieta CTRL	Dieta VDD	Dieta VDD+Ca
Amido de milho	39,7	39,7	17,3
Caseína	20	20	20
Dextrina de milho	13,2	13,2	10
Sacarose	10	10	10
Óleo de soja	7	7	7
Fibra	5	5	5
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	1	1	1
L-cistina	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25
Lactose	-	-	20
Fosfato de cálcio	-	-	2,1
Carbonato de cálcio	-	-	3,5
BHT	0,0014	0,0014	0,0014
Vitamina D3 (UI/kg)	1000	0	0

BHT: hidroxitolueno butilado e UI: unidades internacionais.

Após as seis semanas de dieta, as fêmeas que apresentaram as quatro fases do ciclo estral bem identificadas foram separadas e, no final da tarde de cada dia, colocadas de duas a três em gaiolas contendo um macho. Na manhã do dia seguinte, era feito o lavado vaginal de cada fêmea e a possível gravidez considerada caso fossem visualizados espermatozoides no lavado. Nesses casos, as fêmeas eram separadas em gaiolas individuais e assim permaneceram até o parto. Após 48 h do nascimento, os filhotes eram mantidos em 8 por ninhada (sempre que possível em números iguais de machos e fêmeas) e eutanasiados, após 21 dias (final da lactação) ou mantidos no biotério com uma dieta padrão Nuvilab, até os 180 dias. As proles foram divididas nos seguintes grupos:

GRUPO DE 21 DIAS:

- **Controle Macho (M-CTRL) e Fêmea (F-CTRL):** Filhotes de 21 dias de ratas tratadas com dieta CTRL;
- **Deficiente em Vit. D Macho (M-VDD) e Fêmea (F-VDD):** Filhotes de 21 dias de ratas tratadas com dieta VDD;
- **Deficiente em Vit. D+Ca Macho (M-VDD-Ca) e Fêmea (F-VDD-Ca):** Filhotes de 21 dias de ratas tratadas com dieta VDD+Ca.

GRUPO DE 180 DIAS:

- **Controle Macho (M-CTRL) e Fêmea (F-CTRL):** Filhotes de 180 dias de ratas tratadas com dieta CTRL;
- **Deficiente em Vit. D Macho (M-VDD) e Fêmea (F-VDD):** Filhotes de 180 dias de ratas tratadas com dieta VDD.

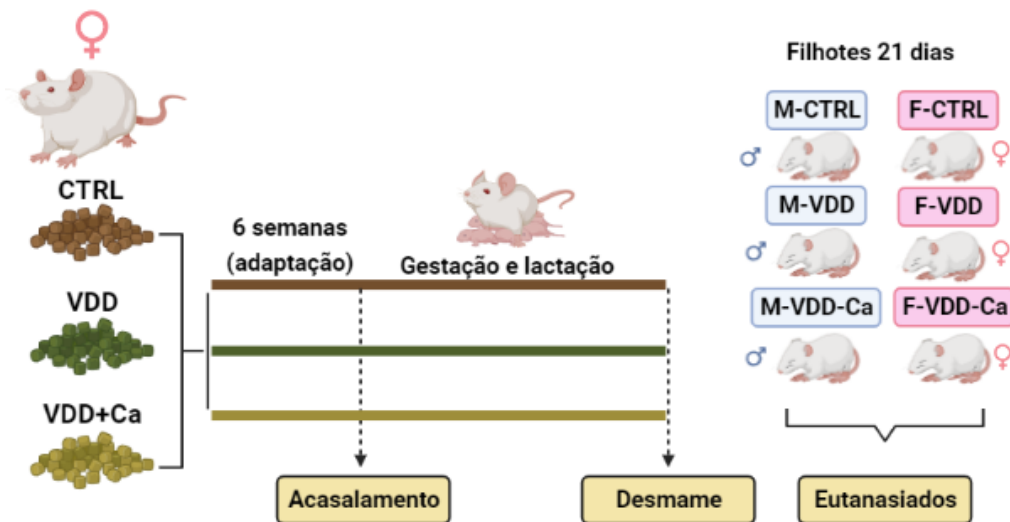
Obs: Nesse grupo, não foi utilizado animais VDD suplementados com Ca²⁺.

O crescimento dos filhotes foi acompanhado pelo peso dos mesmos aos 2 dias e durante as 1^o, 2^o e 3^o semanas de vida. Os filhotes adultos também foram pesados duas vezes por mês,

durante o 1º ao 6º mês de vida. Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália) e eutanasiados por decapitação ou deslocamento cervical e tiveram os músculos esqueléticos (EDL, soleus, tibial anterior e gastrocnêmio), tecidos adiposos brancos (epididimal ou periovariano e retroperitoneal) e sangue coletados para análise. Para a comparação entre músculos com metabolismo distinto, foram escolhidos os músculos EDL ou tibial anterior, tipicamente glicolíticos, e o músculo soleus com metabolismo predominantemente oxidativo.

A **Figura 4** resume o delineamento experimental para a obtenção de animais de 21 (**Figura 4A**) e 180 dias (**Figura 4B**) de idade.

A



B

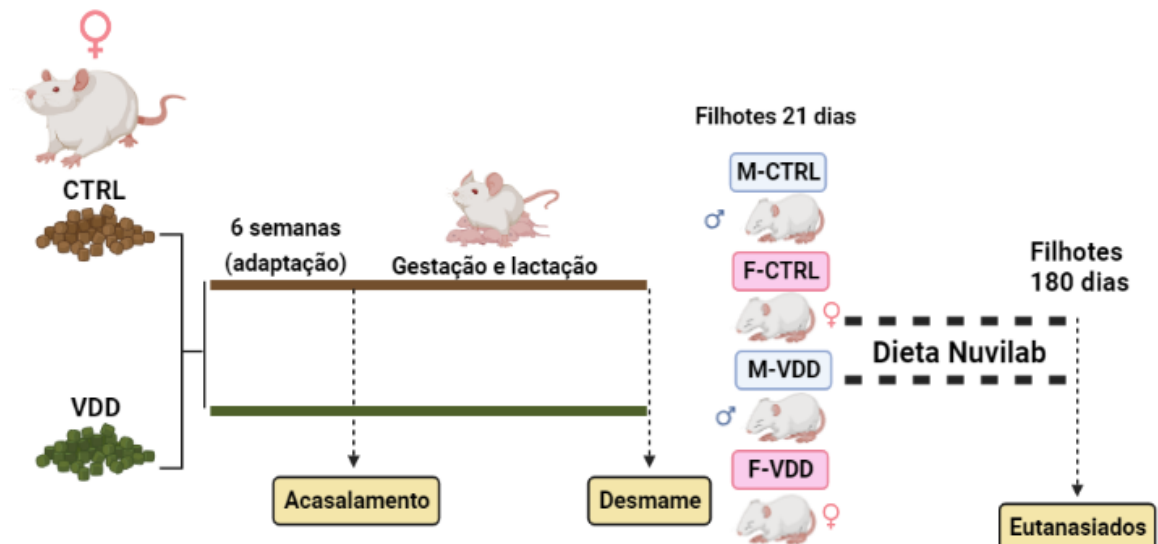


Figura 4: Delineamento experimental. Ratas foram randomicamente divididas em três grupos: dieta controle (CTRL), deficiente em Vit. D (VDD) e deficiente em Vit. D suplementada com Ca^{2+} (VDD+Ca) e permaneceram nessas dietas por seis semanas para adaptação e, durante os períodos de gestação (21 dias) e lactação (21 dias). A prole de machos (M) e fêmeas (F) foram eutanasiadas aos 21 dias (desmame) ou mantidos em dieta Nuvilab padrão até os 180 dias. Desenho criado pela autora no site BioRender.com.

3.2 Coleta de sangue e tecido

O sangue da cauda dos animais de 21 e 180 dias foi utilizado para a determinação da glicemia, no dia da eutanásia. Em seguida, os animais foram anestesiados e decapitados e o sangue foi coletado e centrifugado para a coleta de soro e posterior dosagem de hormônios e metabólitos. Os tecidos adiposos brancos retroperitoneal e epididimal ou periovariano e os músculos EDL, soleus, tibial anterior e gastrocnêmio foram excisados, pesados e congelados para as análises.

3.3 Dosagens hormonais e bioquímicas

A análise sérica de calcidiol da mãe e de seus filhotes foi feita em analisador de quimioluminescência (DiaSorin, Liaison® XL), em colaboração com o Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. A insulina e o PTH séricos foram determinados por ELISA (Millipore e Quidel, respectivamente).

A atividade da citrato sintase foi conduzida em colaboração com a Profa. Luciane Carla Alberici da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da FMRP-USP conforme descrito anteriormente (WILLIAMS *et al.*, 1986). Os músculos esqueléticos foram homogeneizados conforme descrito na seção de análise de Western blotting (ver item 3.5) e foram incubados com meio de reação (50 mM Tris-HCl, 100 μM de ácido 2-dinitrobenzóico, 0,25 % de Triton X-100, pH 8,0 suplementado com 50 μM de acetil- CoA) a 37° C por 5 min, a reação foi iniciada

com a adição de oxaloacetato (250 μM). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína das respectivas amostras.

A dosagem de calcitriol e CYP27B1 (1 α -hidroxilase) no músculo foram realizadas com kits ELISA (Nova Lifetech® e MyBioSource, respectivamente).

Um espectrômetro de absorção atômica Agilent SpectrAA-55B foi usado para realizar as determinações de Ca^{+2} sérico (Agilent Technologies), em colaboração com o Prof. Dr. José Simon Camelo Júnior do Departamento de Pediatria da FMRP-USP.

3.4 Análises histológicas

Os músculos EDL e soleus de animais de 21 e 180 dias foram excisados, colocados em suporte de acrílico e congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . Os músculos foram cortados a -20°C em uma espessura de 10 μm em criostato (Leica CM1850 UV criostato; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

A coloração para células satélites (CSs; Pax7) e a tipagem de fibras dos músculos foi determinada por imunofluorescência (IF) usando, respectivamente, anticorpo Pax-7 (Santa Cruz; 1:40) e a combinação dos seguintes anticorpos monoclonais anti-MHC (miosina de cadeia pesada) (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa): BA-F8 (IgG2b, diluição 1:100) específico para MHC-I, SC-71 (IgG1, diluição 1:100) para MHC-IIA e BF-F3 (IgM, diluição 1:100) para MHC-IIB. As fibras do tipo IIX não foram marcadas e aparecem em preto. A membrana do músculo esquelético foi corada por IF para distrofina (Dys; Abcam; diluição 1:200) e os núcleos foram marcados com DAPI. As imagens foram coletadas no microscópio de fluorescência Olympus BX61VS. Nos **animais de 21 dias**, a área de secção transversa (CSA) de mais de 300 fibras coradas para MHC foi analisada e o número de fibras foi contado em uma área de $850 \mu\text{m}^2$. O número de CSs foi quantificado em todo o músculo EDL e soleus. Nos **animais de 180 dias**, a CSA e o número de núcleos de mais de 500 fibras

por músculo foram quantificadas. O número de fibras e CSs foi contado em todo o músculo EDL e soleus. As análises foram feitas utilizando o software ImageJ (Fiji is Just; versão 1.52p; National Institutes of Health, EUA).

3.5 Análise de proteínas por Western Blot

Os músculos EDL e soleus foram extraídos e homogeneizados em tampão Tris-HCl (50mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1 % de Triton X-100, 1 % de deoxicolato de sódio, 1 % de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5 µg/ml de aprotinina e 1 µg/ml de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100 mM fluoreto de sódio). O homogenato foi centrifugado (14000 rpm, 4°C, durante 20 minutos) e o sobrenadante separado para a determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método de Lowry e eletroforese. Volumes iguais de sobrenadante e tampão da amostra contendo SDS (4 %), Tris-HCl (125 mM), glicerol (20 %), DTT (100 mM) e azul de bromofenol (2 %, pH 6,8) foram misturados, aquecidos a 70°C por 10 min e submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE. A eletro-transferência das proteínas do gel para membrana foi realizada sob a amperagem de 400mA e voltagem de 25 volts em aparato de transferência semi-seco por 30 min. Após o bloqueio das membranas com uma solução de leite desnatado em pó 10 %, diluído em solução TBS-T [Tris-HCl (0,02 M), NaCl (0,16 M) e Tween 20 (0,1 %), pH 7,4], as membranas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na **Tabela 2** e, posteriormente, com um dos anticorpos secundários anti-IgG ligados à peroxidase: anti-IgG de coelho (Cell Signaling®), anti-IgG de camundongo (KPL®) ou anti-IgG de cabra (Sigma®). A revelação foi feita após incubação das membranas com reagente amplificador de quimioluminescência composto por Tris/HCl (1M, pH 8,5), luminol (250mM), ácido cumárico (90mM) e H₂O₂ (0,01 %) e expostas ao fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ System (Bio Rad Laboratories Inc., EUA). A análise das bandas

(densitometria) foi realizada no programa ImageJ. Após a quantificação densitométrica, o valor obtido na análise foi corrigido pela densitometria da β -actina, e os resultados foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100 %).

Tabela 2- Anticorpos utilizados na técnica de Western Blot.

Anticorpo primário	Diluição	Marca	Referência
Myogenin	1/50	Santa Cruz	sc-12732
MyoD	1/400	Santa Cruz	sc-760
IGF-1	1/500	Santa Cruz	sc-9013
Glut4	1/1000	Cell Signaling	#2213
phospho ^{Tyr1135/1136} IGF-I Receptor β / phospho ^{Tyr1150/1151} Insulin Receptor β	1/500	Cell Signaling	#3024
Insulin Receptor β	1/500	Santa Cruz	sc-711
phospho ^{Tyr 989} IRS-1	1/500	Santa Cruz	sc-17200
IRS-1	1/500	Cell Signaling	#2382
phospho ^{Ser 473} Akt	1/500	Cell Signaling	#9271
phospho ^{Thr 308} Akt	1/500	Cell Signaling	#9275
Akt	1/1000	Cell Signaling	#9272
phospho-Ser ^{21/9} GSK3 β	1/750	Cell Signaling	#9331
GSK3 α/β	1/750	Cell Signaling	#9315
phospho ^{Ser 2448} mTOR	1/500	Cell Signaling	#2971
mTOR	1/500	Cell Signaling	#2972
phospho-Ser ^{235/236} S6	1/1000	Cell Signaling	#2211
S6	1/1000	Cell Signaling	#2217
phospho ^{Thr70} 4EBP1	1/1000	Cell Signaling	#9455
4EBP1	1/1000	Cell Signaling	#9452
phospho ^{Ser465/467} Smad2/ phospho ^{Ser423/425} Smad3	1/500	Cell Signaling	#8828
Smad2/3	1/500	Santa Cruz	sc-8332
Atrogin-1	1/1000	Santa Cruz	sc-166806
Murf	1/500	Santa Cruz	sc-32920
Calpain 1	1/500	Santa Cruz	sc-7531
Calpain 2	1/500	Santa Cruz	sc-7533
Calpastatin	1/500	Cell Signaling	#4146s
Phospho-(Ser) PKC Substrate	1/1000	Cell Signaling	#2261s
p35	1/750	Santa Cruz	sc-820
Puromycin	1/1000	Kerafast	eq-0001
β -actin	1/3000	Santa Cruz	sc-81178

3.6 Quantificação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

O RNA dos músculos EDL e soleus foi extraído pelo método do Trizol™ (Invitrogen, EUA) e quantificado por densidade óptica (A) em espectrofotômetro (NanoDrop One/One^C; Thermo Fisher). Alíquota contendo 1 µg de RNA foi tratada com DNase, e foi acrescentado Oligo dT (20 pmols; Invitrogen) e dNTPmix (10 mM; Promega) em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01 % autoclavada). Tão logo ao aquecimento a 70 °C por 5 minutos e posterior resfriamento a 4 °C, foram adicionadas a transcriptase reversa e demais reagentes (tampão de reação, dNTP, água, MgCl₂ e ImProm-IITM Reverse T recombinante) e, assim, submetidas ao ciclo 25°C - 42°C (Termociclador C1000 Touch, Biorad), o qual foi interrompido por aquecimento a 70°C por 15 minutos. Para avaliar a expressão gênica, as amostras de DNAc foram submetidas à RT-PCR utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen, EUA) com Carboxi rodamina (ROX) como controle interno e acrescido dos primers (IDT) para detecção dos genes de interesse (**Tabela 3**). Estes foram amplificados e adquiridos no sistema ABI Prism 7500 (Perkin-Elmer) seguindo os seguintes parâmetros: 50°C (2 min), 95°C (2 min), 40 ciclos de 95°C (15 seg), 57°C (30 seg), 60°C (30 seg), seguido pelo ciclo de dissociação para verificação de um produto através de análise pela curva *melting*. Os dados gerados foram analisados no software ABI Prism/7500 system SDS. Para a análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene foi calculado em referência à expressão da Ciclofilina A na amostra, utilizando-se o método do ciclo *threshold* (Ct). Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100 %).

Tabela 3- Sequência de *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real

Gene	Forward	Reverse
<i>rat Myf-5</i>	GGAATGCAATCCGCTACATT	CAGGGCAGTAGATGCTGTCA
<i>rat MyoD</i>	TACGACGCCGCCTACTACAGTG	GCATCGCTTGAGGATGTCTCC
<i>rat Myogenin</i>	GACGGGGAAAACCTACCTTCC	GTCCCCAGTCCCTTCTCTTC
<i>rat Mrf4</i>	ACAGCTACAAACCCAAGCAAGA	CTTGCTCCTCCTTCTTAGCAG
<i>rat Pax7</i>	GATTAGCCGAGTGCTCAGAATCAAG	GTCGGGTTCTGATTCCACGTC
<i>rat Igf-1</i>	CAGTTCGTGTGTGGACCAAG	TCAGCGGAGCACAGTACATC
<i>rat Myostatin</i>	AGTGACGGCTCTTTGGAAGATG	AGTCAGACTCGGTAGGCATGGT
<i>rat Atrogin-1</i>	CTTTCAACAGACTGGACTTCTCGA	CAGCTCCAACAGCCTTACTACGT
<i>rat Murf</i>	TCGACATCTACAAGCAGGAA	CTGTCCTTGGGAAGATGCTTT
<i>rat Calpastatin</i>	GCTATCACAGGACCTCTTCCAGA	GGTGAAATCAGATGACAAGGCA
<i>rat Calpain 1</i>	ATGGCAGAGGAGTTAATCACA	TTGGCATCCGTCACAGAGTAT
<i>rat Calpain 2</i>	GAAGCCTCCTCCCAATTTGTT	CAGTGACGGAGTACGCATGTC
<i>rat Cyclophylin A</i>	GCATACAGGTCCTGGCATCT	CTTCCCAAAGACCACATGCT

3.7 Avaliação da síntese proteica muscular

A avaliação da síntese proteica muscular foi realizada por meio de duas metodologias distintas devido à característica de cada uma delas. Nos **animais de 21 dias**, a análise de síntese proteica foi feita com os músculos isolados *in vitro*, onde se determinou a velocidade de incorporação de tirosina marcada. Esse método não pode ser utilizado em animais adultos porque o tamanho do músculo isolado impede a difusão adequada do oxigênio e que os tampões penetrem em todo o tecido. Por isso, nos **animais de 180 dias**, a síntese proteica muscular foi avaliada pelo método SUnSET (*Surface Sensing of Translation*). As duas metodologias são descritas a seguir:

3.7.1 Avaliação da síntese proteica pela incorporação de tirosina marcada

A síntese total de proteínas dos animais de 21 dias foi determinada em músculos EDL e soleus que tiveram seus tendões fixos a suportes apropriados para a manutenção dos seus comprimentos de repouso e incubados em tampão Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) (pH 7,4; 37°C), contendo glicose (5 mM) e todos os vinte aminoácidos, em condições semelhantes às encontradas no plasma de ratos (SCHARFF; WOOL, 1964), conforme apresentados na **Tabela**

4. Após o período de 1 hora de pré-incubação, o meio de incubação foi substituído por meio idêntico acrescido de tirosina marcada [¹⁴C]-tirosina (0,1mM; 0,05μCi/ml) tendo permanecido os músculos incubados por um período final de 2 horas. Em seguida, os músculos foram removidos de seus suportes e adicionado 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Após homogeneização e centrifugação (1800G por 10 minutos), 1 ml do sobrenadante foi utilizado para a avaliação da tirosina livre total do músculo e uma alíquota de 100 μL foi usada na medida da radioatividade, para a determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Posteriormente, o precipitado foi lavado com 2 ml de TCA 10 %, adicionado 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %. A contagem da radioatividade foi feita por um espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

Tabela 4: Aminoácidos adicionados ao meio de incubação para avaliação da velocidade de síntese proteica total

Aminoácido	Concentração (mM)	Aminoácido	Concentração (mM)
Ácido Aspártico	0,035	Isoleucina	0,100
Ácido Glutâmico	0,174	Leucina	0,170
Alanina	0,450	Lisina	0,400
Arginina	0,200	Metionina	0,070
Asparagina	0,061	Prolina	0,180
Cisteína	0,070	Serina	0,280
Fenilalanina	0,500	Tirosina	0,100
Glicina	0,400	Treonina	0,300
Glutamina	0,350	Triptofano	0,070
Histidina	0,080	Valina	0,200

3.7.2 Avaliação da síntese proteica *in vivo* pelo método *SUnSET*

Para quantificar a velocidade de síntese proteica *in vivo* em músculos EDL e soleus de animais de 180 dias foi utilizado o método *SUnSET* (GOODMAN; HORNBERGER, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2009). Essa técnica baseia-se na detecção de peptídeos marcados com a puromicina, um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces alboniger* em animais

previamente tratados com esse fármaco. A puromicina tem similaridade estrutural com a molécula de RNA-transportador e por isso, incorpora-se às cadeias polipeptídicas crescentes o que resulta na terminação da elongação destas e consequente liberação do peptídeo ligado à puromicina do ribossomo. Dessa forma, a ligação de peptídeos a esta molécula reflete, proporcionalmente, a taxa de síntese proteica total. Para a aplicação deste método, animais de 180 dias dos diferentes grupos foram tratados (i.p.) com puromicina (Santa Cruz Biotechnology), na concentração de 0,04 $\mu\text{mol/g}$, 30 min antes da eutanásia. A detecção das proteínas recém-sintetizadas (que incorporaram a puromicina) no músculo esquelético foi feita por *Western blot* utilizando um anticorpo anti-puromicina.

3.8 Avaliação da atividade *quimiotripsina-like* do proteassoma

A atividade *quimiotripsina-like* do proteassoma foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Klaude et al (KLAUDE *et al.*, 2007). Músculos tibial anterior de animais de 21 dias e EDL e soleus de animais de 180 dias foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (pH 7,2) contendo 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ e 1,8 mM ATP. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (11000 rpm; 45 min, 4°C) para remover os detritos celulares. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a quantificação da concentração de proteínas da amostra pelo método de Bradford e o restante foi adicionado ao glicerol (10 % vol/vol) para medir a atividade da protease. Duplicatas do sobrenadante foram incubadas com o tampão do ensaio (pH 7,5) contendo 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT e 1 mM ATP acrescido do substrato N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (100 μM ; Sigma Aldrich). Em paralelo, os mesmos procedimentos de incubação foram realizados com a adição do inibidor do proteassoma (MG 132; 50 μM ; Sigma Aldrich) e, em seguida, a reação foi incubada a 37°C. A fluorescência da 7-amino-4-metilcumarina (AMC) foi determinada a cada 10 minutos até 180 minutos. A atividade do

proteassoma foi determinada pela diferença entre a fluorescência de AMC emitida dos sobrenadantes na presença ou ausência de MG 132. Os dados foram expressos em micromoles de AMC por miligrama de proteína/minuto.

3.9 Avaliação da função muscular *in vivo*

A avaliação da função muscular *in vivo* foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). O protocolo de função muscular foi conduzido conforme descrito anteriormente (PEREIRA *et al.*, 2014). Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (20 mg / 100 g de peso corporal, i.p.) e uma incisão lateral foi feita para expor o nervo ciático e um eletrodo foi conectado. Os ratos foram colocados em uma plataforma de acrílico e os tendões dos músculos EDL e soleus foram conectados a um transdutor (Biopac Systems, EUA) que foi utilizado para coletar os dados de força gerados pelas contrações musculares. No início dos experimentos, os músculos foram ajustados ao comprimento ideal (definido como o comprimento que resulta na força máxima de contração). A força tetânica máxima e a força tetânica foram registradas por meio de um sistema de aquisição e análise de dados (AVS Projetos, Brasil). Para medir a força tetânica máxima, um protocolo de estímulo de 180 Hz (para EDL) e 350 Hz (para soleus) foi aplicado para atingir a força máxima de platô com a frequência mínima de 90 Hz (para EDL) e 200 Hz (para soleus), durante o protocolo de avaliação da fadiga muscular, conforme descrito a seguir. Contrações musculares isoladas (0,2 Hz) foram geradas por 2 minutos, seguidas por uma contração tetânica pré-fadiga máxima de 2 segundos (180 Hz para EDL e 350 Hz para soleus). Em seguida, foi realizado um protocolo de fadiga, que consistiu em dez estímulos de 2 segundos (a 90 Hz para EDL e 200 Hz para soleus), cada um seguido de um repouso de 4 segundos. Posteriormente, um período de repouso de 2 minutos (a 0,2 Hz) foi permitido para o músculo. Finalmente, uma contração tetânica máxima

após a fadiga foi induzida por 2 segundos. A fadiga muscular foi avaliada na 1^a, 4^a, 7^a e 10^a contrações. A força tetânica máxima absoluta e a força tetânica foram expressas em milinewtons. A força específica foi determinada pela relação força tetânica absoluta/CSA do músculo, expressa em milinewtons /mm².

3.10 Análise estatística

Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada por ANOVA de dois fatores seguida por um teste post hoc de *Tukey* para comparação múltipla ou teste t de *Student* para as médias de grupos diferentes. A normalidade das variáveis dependentes foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov Smirnov*. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 Resultados referentes às ratas mães

4.1.1 Padronização do modelo experimental

Para a padronização do modelo experimental, as fêmeas virgens foram acompanhadas para o registro do ganho de peso, ingestão de água e ração e glicemia, ao longo das semanas das dietas. Verificou-se que as fêmeas com dieta VDD+Ca, durante a primeira semana, ganharam menos peso que as ratas com dieta CTRL e VDD e isso foi acompanhado por um quadro diarreico nesse grupo (**Figura 5**). Como a dieta VDD+Ca apresenta 20 % de lactose em sua composição, a qual sabidamente aumenta a pressão intraosmótica e favorece a maior solubilidade do Ca^{2+} no íleo e sua absorção por difusão passiva, é provável que isso tenha ocasionado o desconforto intestinal observado. Porém, já na segunda semana de dieta, este sintoma não foi mais observado e o peso foi recuperado. Foi também observado maior ganho de peso das fêmeas com dieta VDD em relação às ratas com dieta CTRL, na terceira semana. Apesar dessas variações ponderais ao longo das semanas, não houve diferença na ingestão de água e ração analisada na quarta semana de dieta (**Figuras 6A e 6B**), assim como do ganho de peso entre os grupos, ao final da sexta semana de acompanhamento.

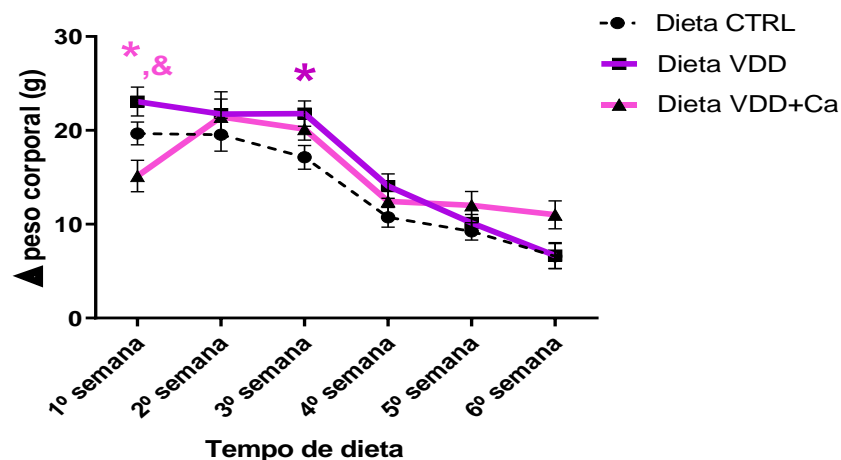


Figura 5: Delta de peso corporal das ratas com dieta controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD+Ca), ao longo das seis semanas anteriores ao acasalamento.

Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL e & $p < 0,05$ versus dieta VDD.

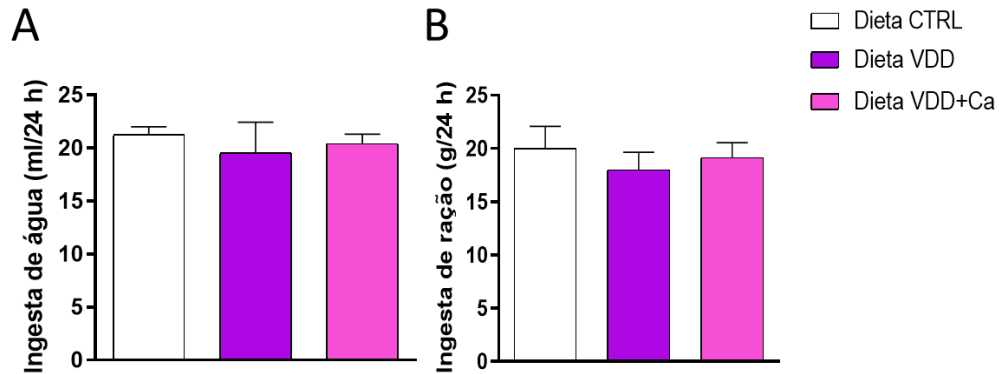


Figura 6: Ingestão de água (A) e ração (B) durante 24 horas, das ratas com dieta controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD+Ca), na quarta semana de acompanhamento. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

Foi observado que a dieta VDD sem e com suplementação de Ca^{2+} alterou a glicemia das ratas. Houve aumento da glicemia em ambos os grupos VDD, na quinta (113 ± 1 mg/dl em ratas VDD e 111 ± 1 mg/dl em VDD+Ca vs. 101 ± 2 mg/dl em CTRL) e sexta (115 ± 2 mg/dl em ratas VDD e 116 ± 3 mg/dl em VDD+Ca vs. 107 ± 2 mg/dl em CTRL; **Figura 7**) semanas de dieta. Esses resultados indicam um possível papel funcional da Vit. D no controle da homeostase glicídica durante a gestação, e sugere que os filhotes VDD são concebidos e desenvolvidos em um ambiente intrauterino hiperglicêmico.

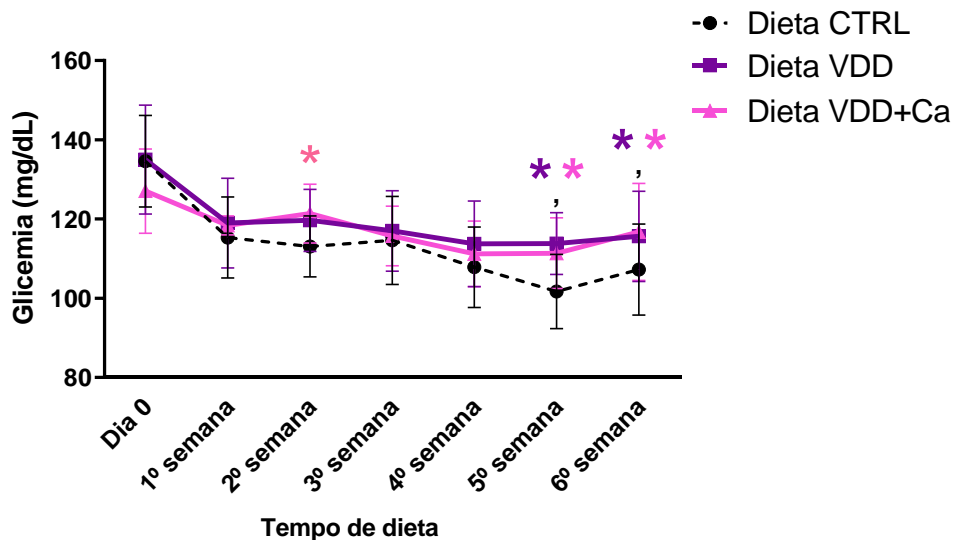


Figura 7: Glicemia das fêmeas com dieta controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD+Ca) ao longo das seis semanas anteriores ao acasalamento. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL.

4.1.2 Alterações do processo reprodutivo nas ratas mães

Para confirmar a eficiência de ambas as dietas VDD, a concentração de calcidiol (25[OH]D3) sérico das ratas foi analisado após o desmame dos filhotes. Houve uma redução significativa de 76 % e 82 % nas concentrações de calcidiol das ratas VDD e VDD+Ca, respectivamente, quando comparadas com o grupo CTRL (**Figura 8**).

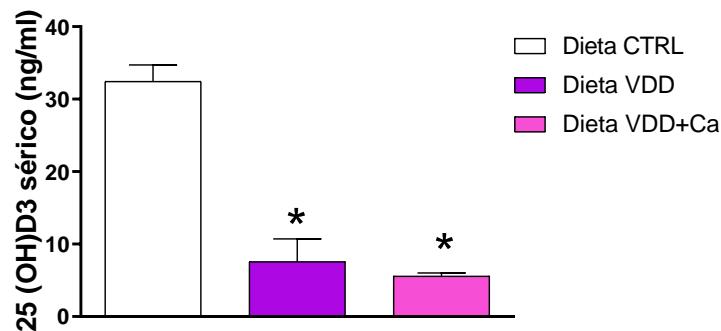


Figura 8: Concentração sérica de calcidiol das ratas com dieta controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD+Ca) analisado após o desmame dos filhotes. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL.

Após as seis semanas de dieta, as ratas foram colocadas para acasalar todos os dias, ao final da tarde. Enquanto as ratas com dieta CTRL engravidaram, em média, após dois encontros com os machos ($2 \pm 0,8$ dias), as fêmeas com dieta VDD e VDD+Ca demoraram mais do que o dobro do tempo ($5 \pm 1,6$ dias e $5 \pm 0,9$ dias, respectivamente). Além disso, 20 % ($n=16$; $p < 0,05$) das ratas em ambas as dietas VDD não engravidaram, após meses de tentativas de acasalamentos, contra 5 % ($n=1$) de fêmeas com dieta controle. Esses resultados mostram que, apesar de nenhum dos grupos ter apresentado alterações no ciclo estral, a depleção de Vit. D diminui as taxas de sucesso de acasalamento em ratas e deve afetar processos que envolvem a reprodução.

4.1.3 Mortalidade materna e fetal e número de filhotes por rata

Durante o período de gestação e até o momento do parto, 18 % (n=7; p<0,05) das ratas com dieta VDD morreram. Não houve mortalidade nos grupos com dieta CTRL e VDD+Ca, o que sugere que a hipocalcemia das ratas VDD (4±0,5 mg/dL em ratas VDD *versus* 7±0,2 mg/dL e 8±0,3 mg/dL dos grupos CTRL e VDD+Ca, respectivamente) deve ser um dos responsáveis pelas mortes nesse grupo. Foi observado ainda alopecia em algumas ratas de ambos os grupos com dieta VDD, um efeito também relatado por outros estudos com modelo experimental semelhante. Em relação à mortalidade fetal, uma das ratas grávidas de cada um dos grupos pariu filhotes natimortos.

Uma das consequências do estresse nutricional materno é a redução no número da prole (BERNAL *et al.*, 2010). De fato, as ratas prenhes dos grupos VDD e VDD+Ca tiveram redução de 36 % e 24 %, respectivamente, no número de filhotes quando comparadas com as ratas controles (**Figura 9**). Esses dados reforçam o prejuízo em processos reprodutivos decorrentes da falta de Vit. D em ratas e estão de acordo com dados anteriores da literatura (CIEPIELA *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018) que mostraram a importância deste hormônio na regulação do desenvolvimento de folículos ovarianos, assim como na qualidade dos mesmos.

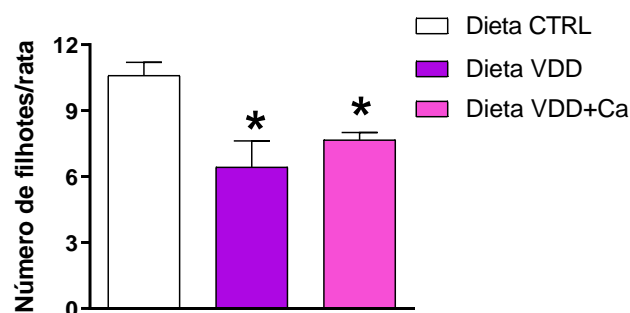


Figura 9: Número de filhotes nascidos vivos das ratas mães com dieta controle (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca²⁺ (VDD+Ca). Os dados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 *versus* dieta CTRL.

4.2 Resultados dos filhotes de 21 dias

4.2.1 Parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais na prole de 21 dias

Ambos os grupos de machos e fêmeas VDD e VDD+Ca de 21 dias apresentaram concentrações séricas extremamente baixas de calcidiol. Os animais VDD de ambos os sexos apresentaram também hipocalcemia e desenvolveram, em resposta, um quadro de hiperpatireoidismo secundário, enquanto que a suplementação de Ca^{2+} mostrou-se eficaz em normalizar a concentração de Ca^{2+} e reduzir a de PTH para valores abaixo dos controles (**Tabela 5**). Foi observado alopecia em alguns animais VDD e VDD+Ca de ambos os sexos.

Durante o desmame, os filhotes machos de mães com dietas VDD e VDD+Ca apresentaram um atraso no crescimento, o qual foi constatado pela redução de peso corporal, em relação aos controles. Efeito semelhante foi observado no grupo F-VDD-Ca (**Figura 10A**). Os machos VDD também apresentaram comprimento total e da tíbia menores (**Figuras 10B e 10C**). Em função das alterações do peso e do comprimento da tíbia, os pesos dos tecidos são apresentados em valores absolutos. Como pode ser observado na **Tabela 5**, os animais do grupo M-VDD e M-VDD-Ca também apresentaram redução de peso dos tecidos adiposos brancos epididimal (72 % e 60 %, respectivamente) e retroperitoneal (63 % e 71 %, respectivamente), assim como dos músculos EDL (32 % e 25 %, respectivamente), soleus (32 % em ambos os grupos), tibial anterior (33 % em ambos os grupos) e gastrocnêmio (35 % e 46 %, respectivamente), quando comparados aos controles. É importante ressaltar que essas alterações não foram encontradas nos grupos F-VDD e F-VDD-Ca.

Diferenças de gênero esperadas entre M-CTRL e F-CTRL também foram observadas no peso do músculo tibial anterior e do TAB retroperitoneal, mas não houve diferença de peso corporal entre esses grupos (**Tabela 5**).

Com relação aos parâmetros metabólicos e hormonais, M-VDD e M-VDD-Ca, tiveram redução significativa da concentração sérica de insulina, o que não foi evidenciado nos grupos

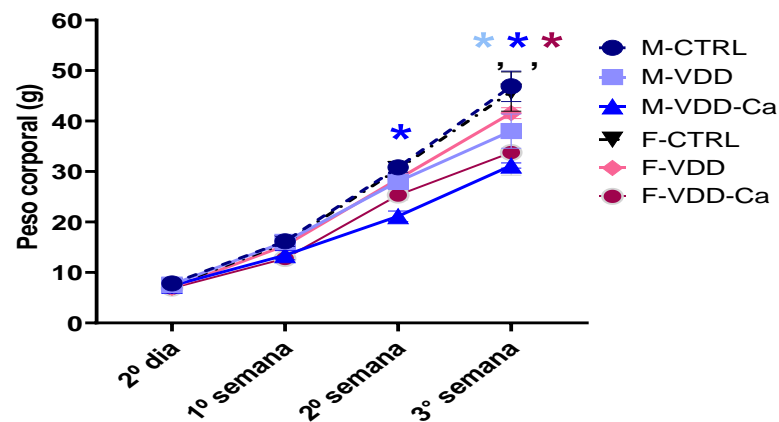
das fêmeas VDD (**Tabela 5**). Portanto, esses dados sugerem que a hipoinsulinemia observada nos grupos de machos VDD não é resultante da hipocalcemia ou do hiperparatireoidismo secundário, uma vez que a dieta VDD+Ca conseguiu reverter estes parâmetros.

Tabela 5: Efeito da deficiência materna de Vit. D (VDD) nos parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais na prole de machos e fêmeas aos 21 dias de idade

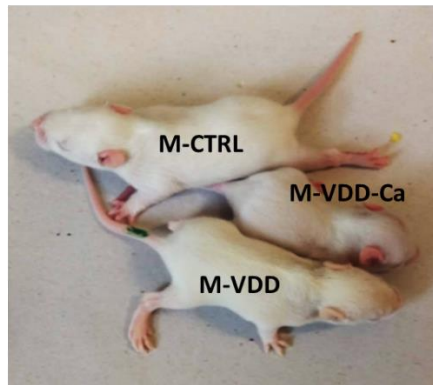
	Macho-CTRL	Macho-VDD	Macho-VDD-Ca	Fêmea-CTRL	Fêmea-VDD	Fêmea-VDD-Ca
Calcidiol sérico (ng/ml)	29±0,9	5±0,3 *	6±0,5 *	28±0,8	5±0,4 *	5±0,2*
Ca ⁺² sérico (mmol/L)	2±0,1	1,7±0,1 *	2,3±0,2	2±0,2	1,7±0,2 *	2±0,2
PTH (pg/ml)	170±29 #	2534±83 *,#,&	16±1*	829±255	1003±373&	34±8*
Glicemia (mg/dl)	127±3	124±2	127±3	126±3	124±1	128±3
Insulina (ng/ml)	2±0,6	0,8±0,1*	0,5±0,1 *	1,3±0,3	1,4±0,3	1,1±0,2
TAB epididimal (peso absoluto em mg)	89±13	25±4 *	36±11 *	-	-	-
TAB retroperitoneal (peso absoluto em mg)	117±44 #	44±8 *,#	34±11 *,#	66±2	56±4	58±1
EDL (peso absoluto em mg)	16±1	11±0,8 *	12±0,4 *	15±1	15±0,5	14±0,5
Soleus (peso absoluto em mg)	19±1	13±0,8 *,#	13±0,5 *,#	17±1	18±0,7	16±0,3
Tibial anterior (peso absoluto em mg)	73±4 #	49±4 *,#	49±2 *,#	68±6	65±1	66±0,5
Gastrocnêmio (peso absoluto em mg)	111±5	73±12 *,#	60±1 *,#	110±11	104±4	105±2
Peso corporal (g)	44±2	32±1*, #	32±1*, #	42±3	40±1	40±0,5

Ca⁺²: cálcio; PTH: Hormônio da paratireoide; TAB: tecido adiposo branco e EDL: *extensor digitorum longus*. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 *versus* dieta CTRL; & p<0,05 *versus* dieta VDD e # *versus* machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental.

A



B



C

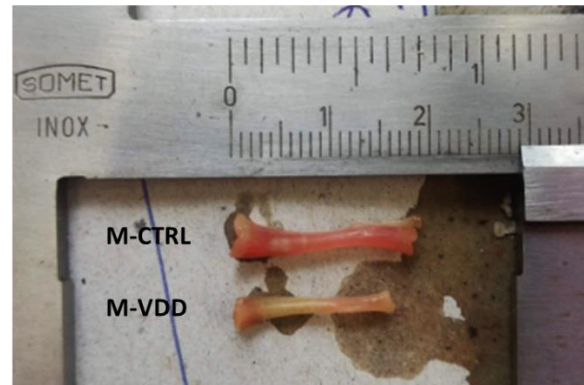


Figura 10: Curva de crescimento corporal da prole de ratos machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD-Ca), do segundo ao 21º dia de vida (A). Imagem representativa do comprimento total (do focinho a ponta da cauda) de machos dos diferentes grupos com duas semanas de vida (B) e das tíbias dos filhotes machos CTRL e VDD com três semanas (C). Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL.

4.2.2 Fenótipo muscular da prole aos 21 dias

A análise da CSA e da tipagem das fibras foi feita por meio da marcação para os diferentes tipos de MHC dos músculos EDL e soleus (**Figura 11A**). A VDD materna em filhotes machos, mas não em fêmeas, induziu alterações no crescimento do músculo EDL como pode ser observado pela redução no número de fibras (em $850 \mu\text{m}^2$ de área) em M-VDD (42 %) e M-VDD-Ca (43 %) quando comparados aos controles (**Figura 11B**). Esses animais apresentaram ainda atrofia das fibras musculares de EDL. O grupo M-VDD mostrou redução

significativa da área de fibras MHC-IIX (58 %) e MHC-IIB (32 %), enquanto que M-VDD-Ca apresentou redução na área de MHC-IIB (56 %), MHC-IIBX (60 %), MHC-IIX (62 %), MHC-IIAX (53 %), MHC-IIA (53 %) e MHC-I (51 %) quando comparados a M-CTRL (**Figura 11C**). Essas alterações podem ser melhor visualizadas nas **Figuras 11D e 11E** que mostram as curvas de distribuição das frequências de áreas das diferentes isoformas de miosinas. Pode-se verificar que as curvas dos grupos M-VDD e M-VDD-Ca se deslocam para a esquerda, o que indica uma maior quantidade de fibras de menor área no músculo EDL desses animais. Além disso, é possível observar que os animais do grupo M-VDD-Ca apresentam uma atrofia muscular mais pronunciada que a de M-VDD.

No músculo soleus, não foi observado alteração no número e na área das fibras musculares (**Figura 11F e 11G**). Entretanto, quando as fibras desse músculo (MHC-I e MHC-IIA) foram separadas por áreas delimitadas, verificou-se um claro deslocamento da curva para a esquerda dos grupos M-VDD e M-VDD-Ca, em relação aos seus controles (**Figuras 11H e 11I**). Isso mostra que a área dessas fibras no soleus é menor, embora a atrofia observada não seja tão pronunciada quanto a que foi observada em EDL.

Com o objetivo de investigar se a VDD materna induzia mudanças no tipo de fibra muscular, a proporção das diferentes miosinas foi analisada nos músculos EDL e soleus. Nenhuma mudança foi encontrada no músculo EDL (**Figura 12A**), enquanto que, em soleus, houve apenas diferenças entre sexos. O grupo F-CTRL teve menor percentil de fibras IIA que M-CTRL, assim como F-VDD-Ca apresentou uma menor proporção de fibras do tipo I em relação a M-VDD-Ca (**Figura 12B**).

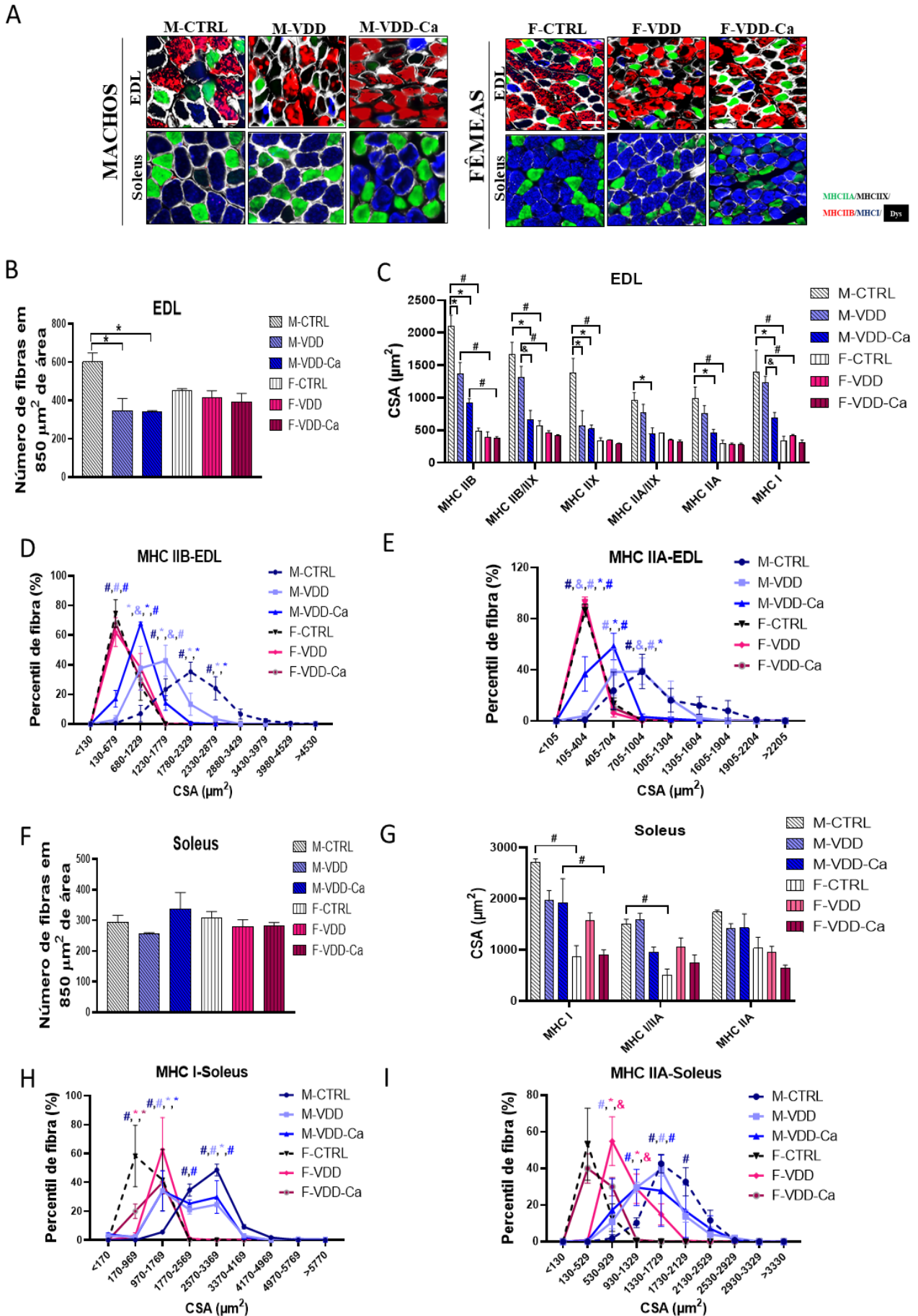


Figura 11: Imagens representativas da imunolocalização de miosinas de cadeia pesada (MHC) dos músculos EDL e soleus dos grupos de machos (M; painel à esquerda) e fêmeas (F; painel à direita) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida (A). Número de fibras musculares/850 μm^2 de área do EDL (B), média das áreas transversais (C) e histograma de frequência de fibras MHC-IIB e MHC-IIA (D e E, respectivamente). Número de fibras musculares/850 μm^2 de área do soleus (F), média das áreas transversais (G) e histograma de frequência de fibras MHC-I e MHC-IIA (H e I, respectivamente). Barra de escala, 50 μm . Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

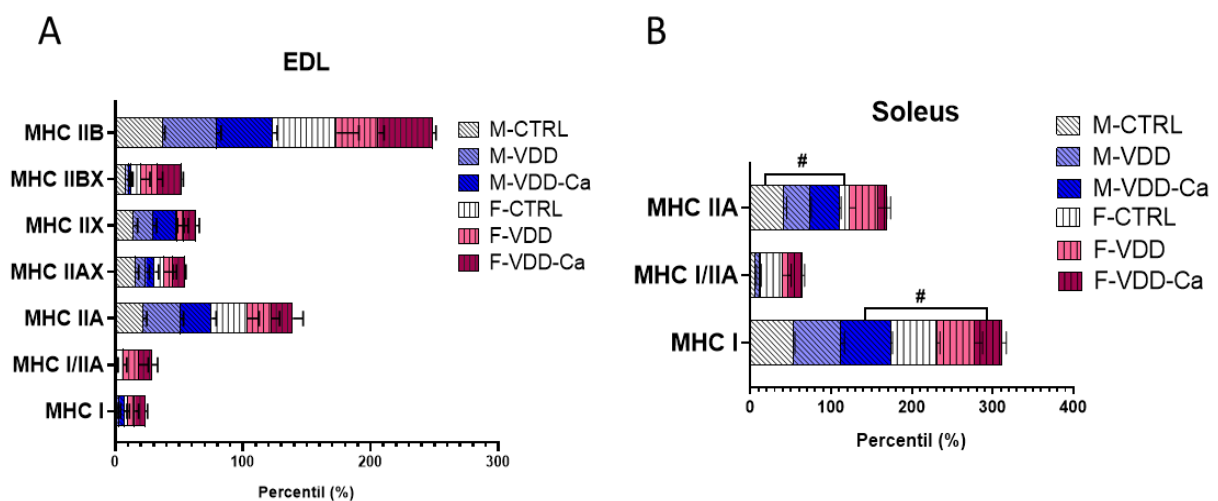


Figura 12: Percentil dos diferentes tipos de fibras nos músculos EDL (A) e soleus (B) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

Em seguida, foi realizada a imunomarcção para Pax7, um marcador de CSs. Não houve alteração significativa no número de CSs em nenhum dos grupos experimentais em EDL (**Figuras 13A e 13B**) e soleus (**Figuras 13C e 13D**). Como pode ser observado nestes gráficos, os valores do grupo M-CTRL foram bastante heterogêneos, o que pode justificar a falta de significância.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a Vit. D materna, independentemente do metabolismo do Ca^{2+} , exerce um papel na manutenção da estrutura muscular esquelética, principalmente em fibras musculares glicolíticas da prole de ratos machos jovens. Além disso,

os dados indicam que a prole de ratas fêmeas jovens é menos susceptível aos danos morfológicos musculares causados pela VDD durante a gestação e a lactação.

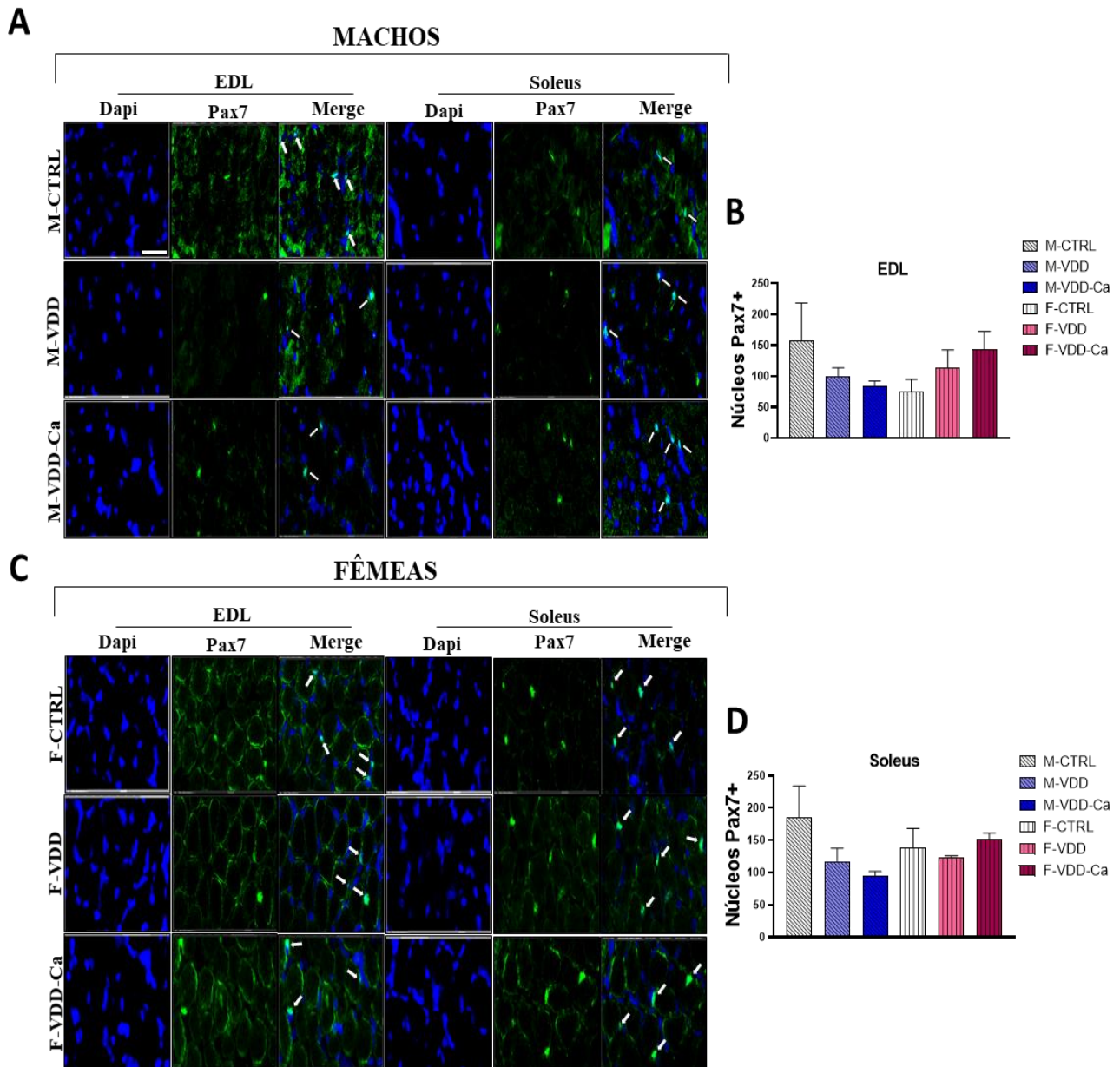


Figura 13: Imunolocalização de células satélites (Pax 7) e análise quantitativa do número de núcleos positivos para Pax7 em EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos de machos (M; painel superior) e fêmeas (F; painel inferior) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. As setas mostram os núcleos Pax 7+. Barra de escala, 50 μm . Os dados estão expressos como média \pm SEM (n=6).

4.2.3 Alterações do metabolismo de proteínas em músculos da prole de 21 dias

Para investigar os mecanismos intracelulares envolvidos na perda de massa induzida pela VDD materna na prole masculina, procedeu-se a análise dos processos de síntese e degradação de proteínas nos músculos desses animais. Em machos, a síntese proteica, avaliada pela incorporação de tirosina marcada em músculos isolados, foi significativamente reduzida em soleus do M-VDD e curiosamente, maior em EDL e soleus do grupo M-VDD-Ca (**Figuras 14A e 14B**). Entretanto, esse aumento induzido pela suplementação com Ca^{2+} não foi capaz de reverter a atrofia muscular desses animais, o que sugere que a degradação proteica deve estar excedendo à síntese e sugere que esta suplementação esteja ativando vias proteolíticas. Em fêmeas, a síntese de proteínas em EDL e soleus não foi reduzida pela VDD, mas foi aumentada em soleus pela suplementação com Ca^{2+} .

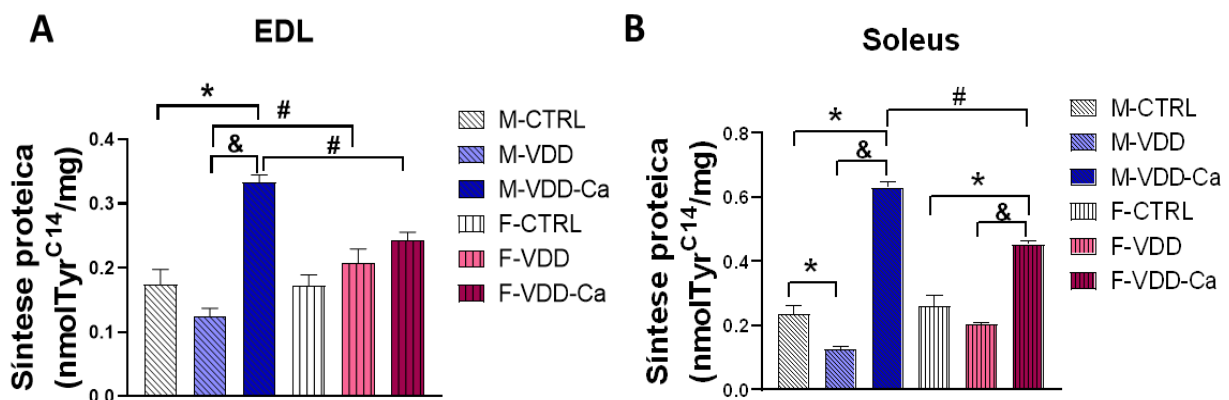


Figura 14: Síntese proteica estimada pela incorporação de tirosina marcada em proteínas de músculos EDL (A) e soleus (B) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental ($n=10$).

Em seguida, foi analisada a atividade do proteossoma, o principal complexo enzimático responsável pela degradação das proteínas sarcoméricas que leva à atrofia muscular (SANDRI, 2013). Observou-se que o músculo tibial anterior (tipicamente glicolítico) das fêmeas VDD, mas não as do grupo suplementado, apresentou redução na atividade do proteossoma (**Figura**

15). Não se observou, entretanto, nenhuma alteração na atividade enzimática do proteassoma nos grupos de machos VDD, o que sugere que outras vias de degradação proteica devam ser as responsáveis pela atrofia muscular desses animais. Com a finalidade de testar a hipótese de que o aumento das concentrações de Ca^{+2} seria o responsável pela atrofia mais severa nesses animais, foi analisado o conteúdo das proteases dependentes de Ca^{2+} .

Em ambos os músculos (EDL e soleus) da prole de ratos machos, foi observado aumento de calpaína-2 em M-VDD (3 vezes em EDL e 2 vezes em soleus versus M-CTRL; **Figuras 16 e 17**). No músculo EDL, a suplementação materna de Ca^{+2} (M-VDD-Ca) também levou à ativação da PKC, avaliada indiretamente por meio de seus substratos fosforilados (**Figura 18**) e a um robusto aumento do conteúdo proteico de calpaína-2 (6,5 vezes versus M-CTRL e 2 vezes versus M-VDD; **Figuras 16A e 16B**), de sua expressão gênica (50 % versus M-CTRL; **Figura 16C**) e na clivagem do seu substrato p35 em p25 (~2 vezes versus M-CTRL e M-VDD; **Figura 16B**). No músculo soleus, M-VDD-Ca apresentou aumento do conteúdo proteico de calpaínas-2 (3 vezes versus M-CTRL e 2 vezes versus M-VDD; **Figuras 17A e 17B**) e gênico (55 % versus M-CTRL; **Figura 17C**). Não foi observado alterações no conteúdo e expressão gênica de calpaína-1 e calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas, em EDL e soleus de ambos os grupos VDD de machos.

Em EDL da prole feminina VDD, observou-se aumento do conteúdo proteico de calpaína 2 (78 % versus F-CTRL), sem mudanças em p35 e p25 (**Figuras 16A e 16B**). Por outro lado, em soleus, houve expressivo aumento no conteúdo proteico de calpastatina (82 % versus F-CTRL; **Figura 17B**) e redução de *calpastatina* (46 % versus F-CTRL; **Figura 17C**) e *calpaína-2* (51 % versus F-CTRL; **Figura 17C**). Ainda, em EDL do grupo F-VDD-Ca, observou-se aumento do conteúdo de calpaína-2 (2 vezes versus F-CTRL e 52 % versus F-VDD), porém isso não foi refletido na clivagem de p35 em p25 (**Figuras 16A e 16B**). Em soleus, F-VDD-Ca apresentou aumento do conteúdo proteico de calpastatina (110 % versus F-

CTRL) acompanhado de redução da *calpaína-2* (46 % versus F-CTRL) e *calpastatina* (43 % versus F-CTRL; Figuras 17A, 17B e 17C).

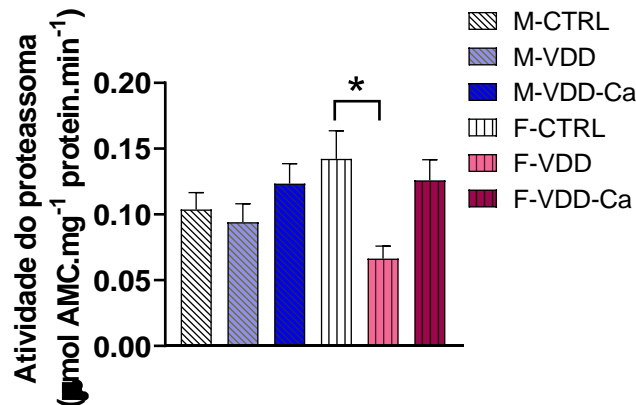


Figura 15: Atividade *quimiotripsina-like* do proteassoma no músculo tibial anterior dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL (n=10).

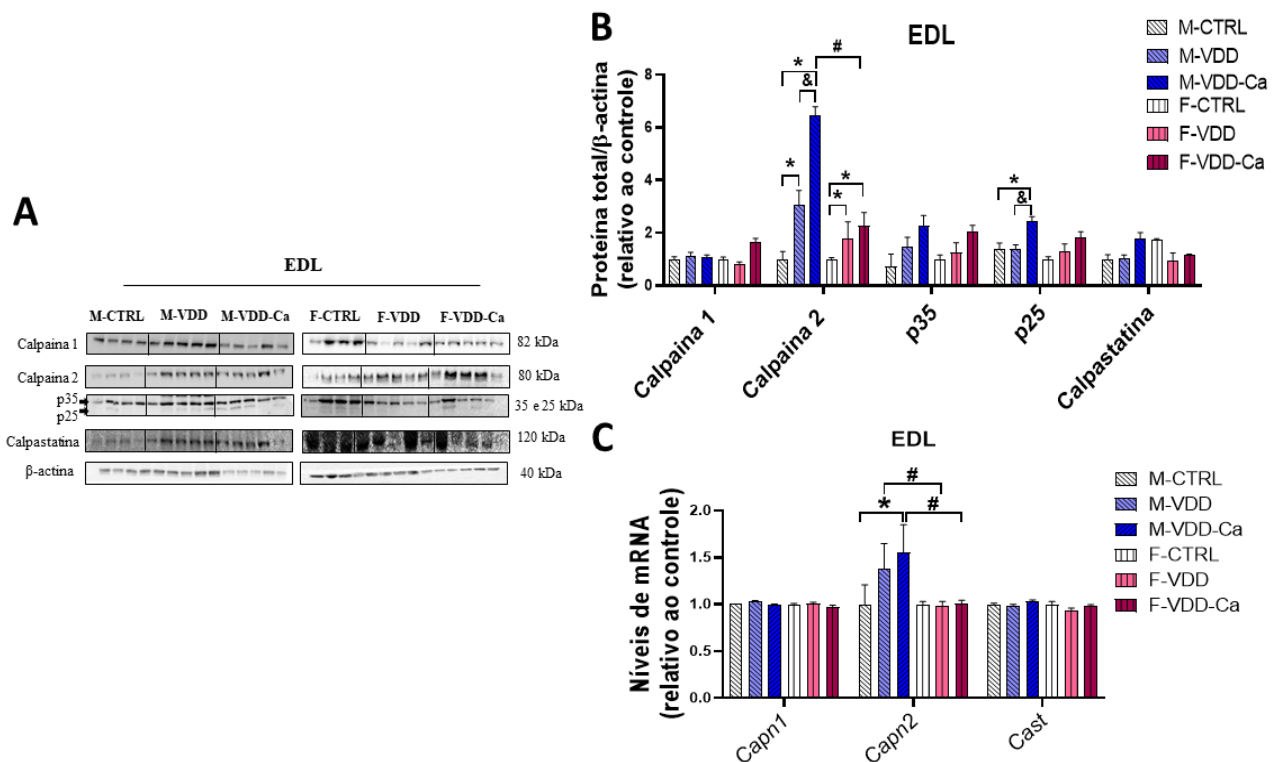


Figura 16: Imagens representativas da técnica de Western blot (A), análise densitométrica de proteínas totais (B) e expressão de genes relacionados ao sistema das calpaínas (C) no músculo EDL dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus

dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

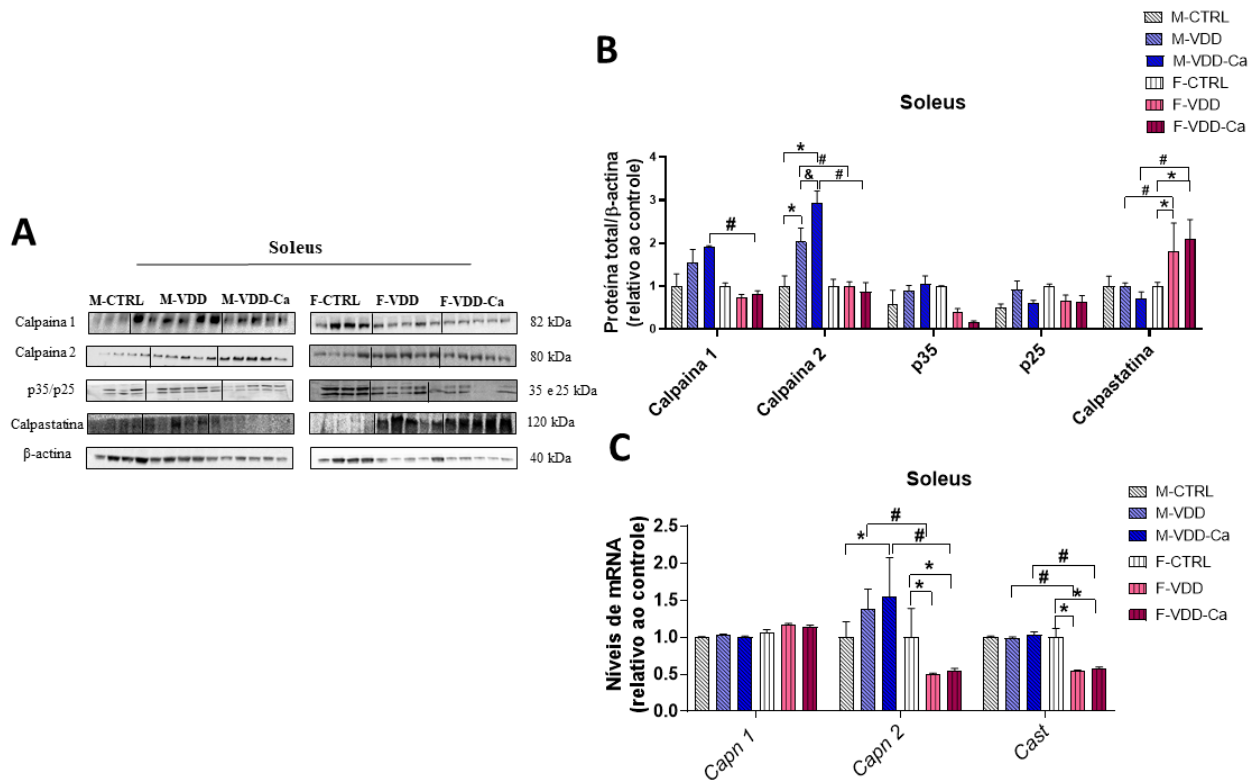


Figura 17: Imagens representativas da técnica de Western blot (A), análise densitométrica de proteínas totais (B) e expressão gênica (C) de genes relacionados ao sistema das calpaínas no músculo soleus dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

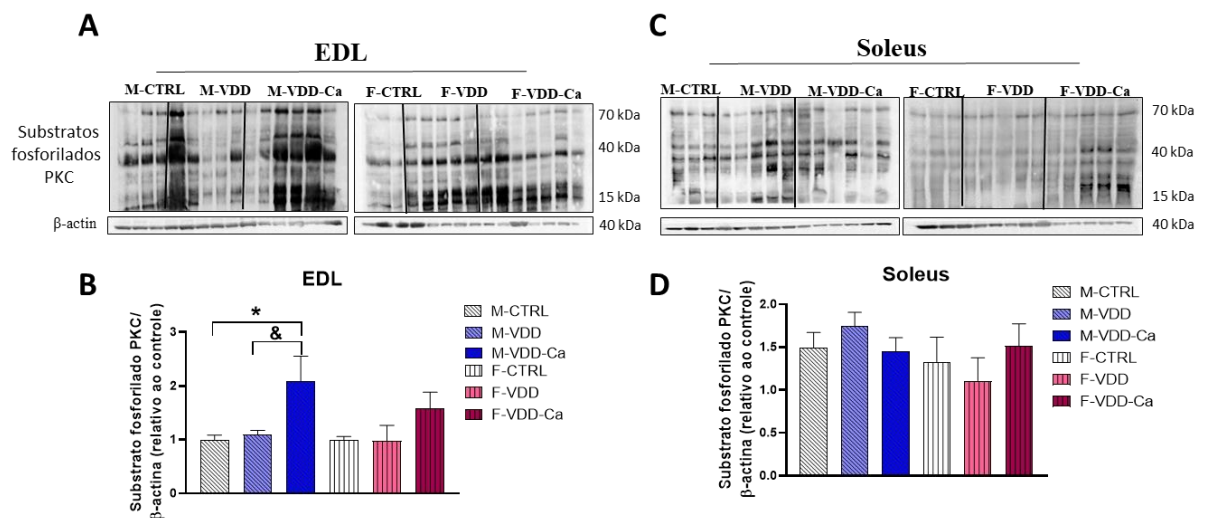


Figura 18: Imagens representativas da técnica de Western blot para substratos fosforiladas de PKC e análise densitométrica em EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos

de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{2+} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

Em conjunto, esses dados mostram que o EDL da prole de ratos machos e fêmeas e músculos soleus de machos VDD apresentam aumento na proteólise dependente de Ca^{2+} , mediada principalmente pela calpaína-2 e este efeito é ainda maior quando as mães são suplementadas com Ca^{2+} . Dessa forma, sugerimos que a ativação das calpaínas seja um dos mecanismos intracelulares responsáveis pela atrofia muscular observada na prole masculina desses dois grupos experimentais. O aumento do conteúdo da calpastatina em soleus de fêmeas pode ter prevenido a ativação das calpaínas e, conseqüentemente, a atrofia deste músculo nos grupos VDD.

4.2.4 Vias de sinalizações relacionadas ao metabolismo de proteínas musculares da prole de 21 dias

Para elucidar as vias de sinalizações e proteínas relacionadas aos processos de síntese e degradação de proteínas, investigou-se o conteúdo e estado de fosforilação de proteínas chaves desses processos em músculos da prole de animais VDD sem e com suplementação com Ca^{2+} . Verificou-se que, tanto em EDL como em soleus de machos, essas proteínas não foram afetadas pela VDD. Entretanto, em EDL do grupo M-VDD-Ca houve redução no conteúdo total e no estado de fosforilação do receptor de Insulina/IGF-1 (46 % e 57 %, respectivamente), bem como de Tyr⁹⁸⁹ p-IRS1 (63 %) quando comparado ao M-CTRL (**Figuras 19A, 19B e 19C**). Quando comparado ao M-VDD, EDL do M-VDD-Ca também mostrou redução no conteúdo total e fosforilado do receptor de Insulina/IGF-1 (36 % e 55 %, respectivamente) e de Tyr⁹⁸⁹ p-IRS1 (64 %). Ao contrário do EDL, o músculo soleus do M-VDD-Ca apresentou um aumento significativo no conteúdo de Tyr⁹⁸⁹ p-IRS1 (156 %), Ser⁴⁷³ p-Akt (115 %) e Ser^{21/9} p-GSK-3 β (37 %), em relação ao M-VDD (**Figuras 20A, 20B e 20C**), e de Ser^{21/9} p-GSK-3 β (67 %),

em relação ao M-CTRL. Não se observou alterações no conteúdo de Ser²⁴⁴⁸ p-mTOR e seu alvo *downstream* Ser^{235/236} p-S6 em M-VDD-Ca em nenhum dos músculos analisados. Vale à pena ressaltar que a ativação da sinalização da via PI3K/Akt induzida pela suplementação de Ca²⁺ em soleus, foi concordante com o aumento da síntese proteica observada, especificamente, nesse músculo.

Em seguida, procedeu-se a análise de proteínas envolvidas na regulação negativa da massa muscular como a atrogina-1 e *miostatina*. Em concordância com o estado atrófico mais pronunciado em EDL de animais dos grupos M-VDD e M-VDD-Ca, verificou-se nesses músculos, mas não em soleus, um aumento no conteúdo proteico de atrogina-1 (46 % em M-VDD e 53 % em M-VDD-Ca) quando comparados ao grupo M-CTRL (**Figura 20D**). Nenhum dos músculos apresentou alteração na expressão gênica de *atrogina-1* e *miostatina* (**Figura 20E**).

Em relação à modulação da via de sinalização PI3K/Akt nas fêmeas, foi observada resposta muito semelhante à dos machos. Em EDL, F-VDD-Ca apresentou redução na fosforilação do receptor de Insulina/IGF-1 (41 % versus F-CTRL e 46 % versus F-VDD) e de Tyr⁹⁸⁹ p-IRS1 (44 % versus F-CTRL e 29% versus F-VDD) (**Figuras 19A, 19B e 19C**). No músculo soleus, a suplementação de Ca²⁺ também se mostrou benéfica, sendo observado aumento no conteúdo proteico de Ser⁴⁷³ p-Akt (3X versus F-CTRL e 76 % versus F-VDD) e Ser^{21/9} p-GSK-3β (98 % versus F-CTRL e 37 % versus F-VDD) (**Figuras 20A, 20B e 20C**). Um achado interessante foi que ambos os músculos das fêmeas VDD (42 % em EDL e 35 % em soleus) e VDD-Ca (56 % em EDL e 36 % em soleus) apresentaram redução do conteúdo de atrogina-1 quando comparadas a F-CTRL (**Figuras 19D e 20D**) e, em soleus, houve ainda redução da expressão de *miostatina* (55 % em F-VDD e 51 % em F-VDD-Ca *versus* F-CTRL) (**Figura 20E**).

Esses dados reforçam os achados de que a resposta muscular de ratos jovens ao VDD materno é sexo-específica e que os músculos das fêmeas, de alguma forma, respondem a esse insulto com redução da atividade do proteassoma, como mostrado anteriormente (ver item 4.2.3) e de reguladores negativos da massa muscular (atrofina-1 e *miostatina*), o que provavelmente explica porque músculos EDL e soleus das fêmeas VDD não desenvolvem atrofia. Além disso, esses resultados mostram que a suplementação materna de Ca^{2+} ativa a sinalização da via PI3K/Akt em músculos soleus, enquanto reduz a sinalização em EDL da prole de machos e fêmeas.

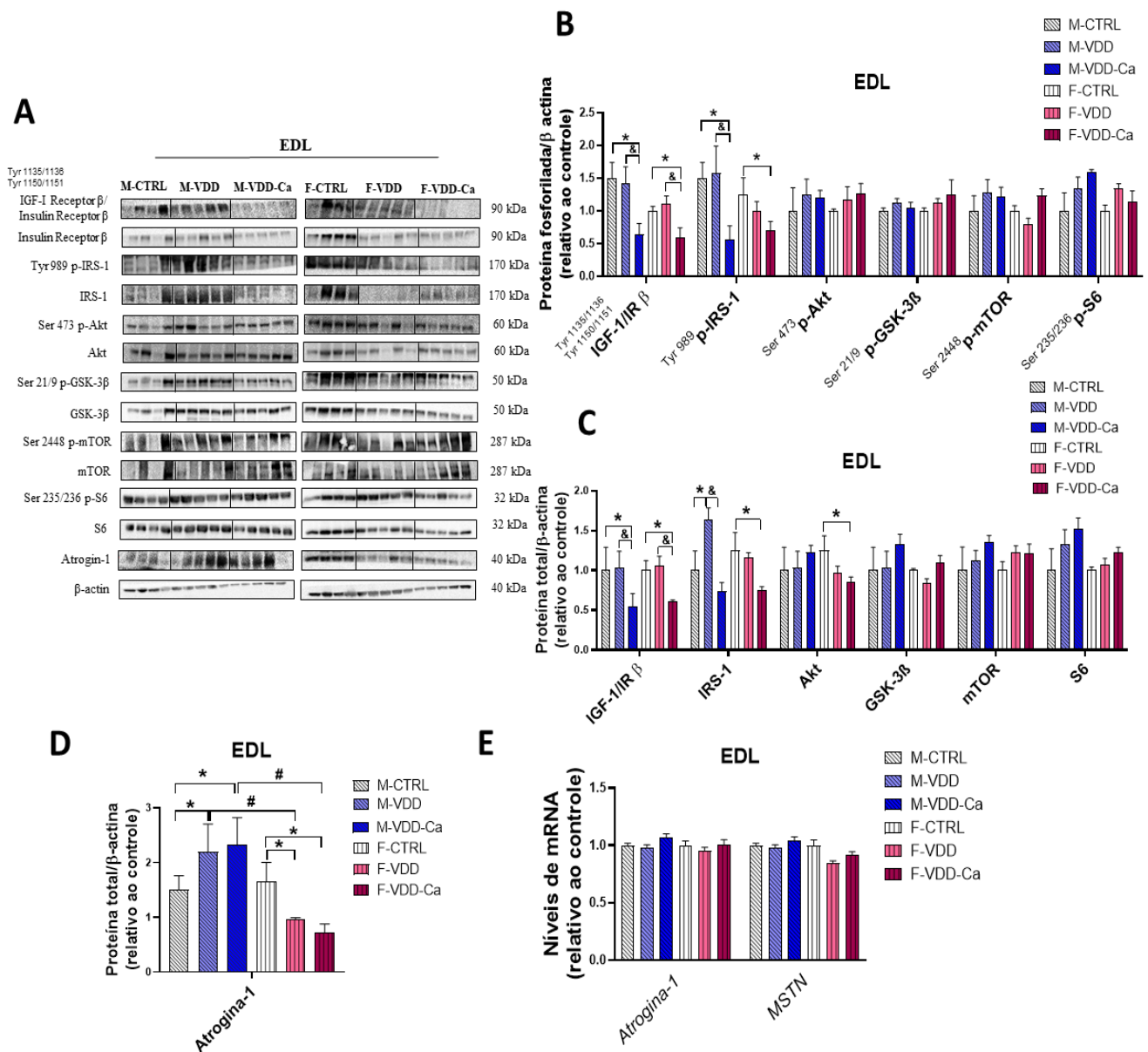


Figura 19: Imagens representativas da técnica de Western blot (A), análise densitométrica de proteínas fosforiladas (B) e totais (C) relacionadas à síntese de proteínas no músculo EDL dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Análise densitométrica de Atrogina-1 (D) e expressão gênica de reguladores negativos da massa muscular no músculo EDL (E). Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

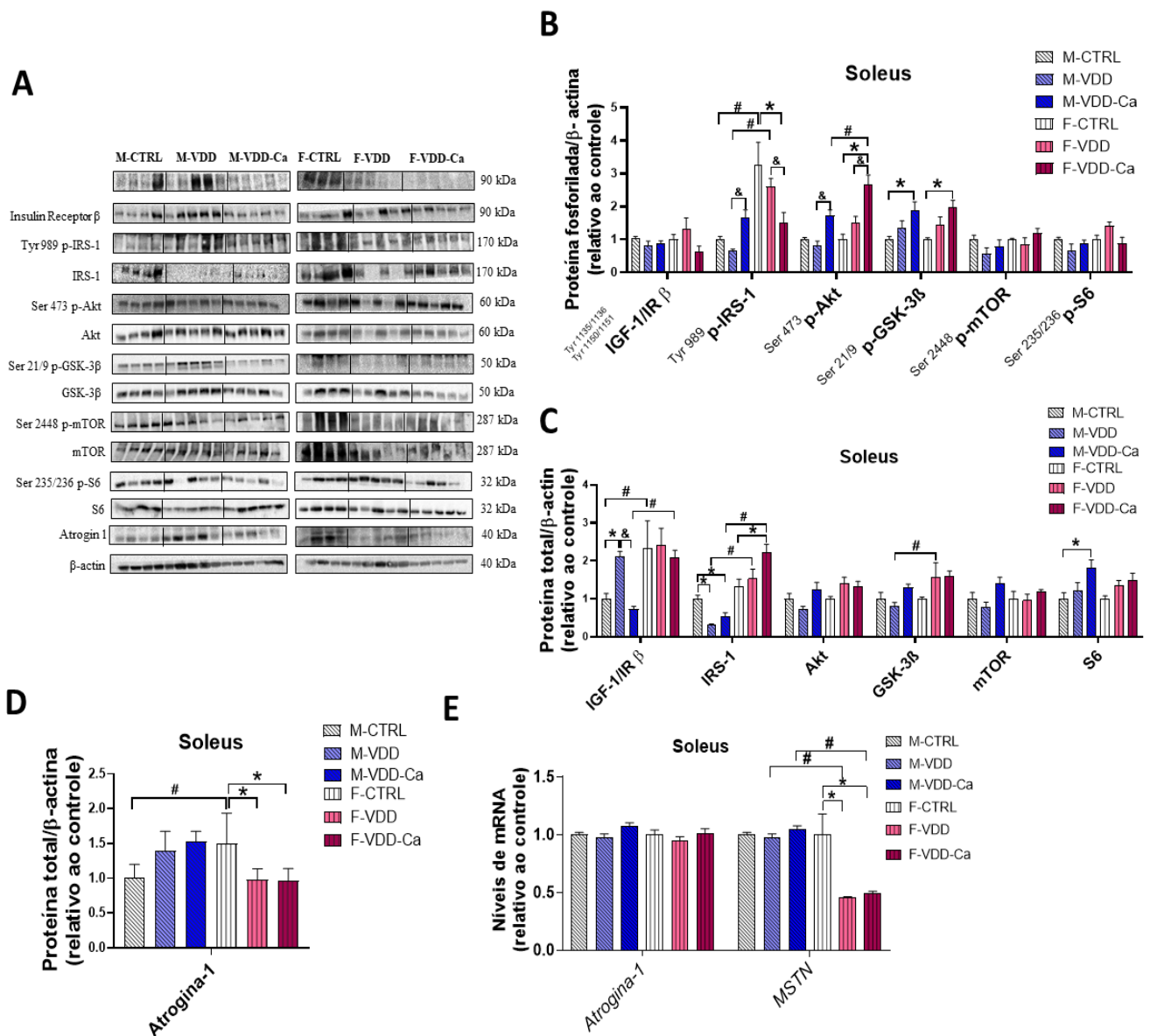


Figura 20: Imagens representativas da técnica de Western blot (A), análise densitométrica de proteínas fosforiladas (B) e totais (C) relacionadas à síntese de proteínas no músculo soleus dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Análise densitométrica de Atrogina-1 (D) e expressão gênica de reguladores negativos da massa muscular no músculo soleus (E). Os dados estão expressos como média

± SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

4.2.5 Metabolismo local de Vit. D no músculo esquelético da prole aos 21 dias

Uma vez que estudos recentes têm mostrado a existência de um metabolismo intrínseco de Vit. D no músculo esquelético, principalmente nos estágios iniciais da vida, foi investigado se a redução na produção de Vit. D muscular poderia ser um dos fatores contribuintes para a atrofia observada nos animais M-VDD e M-VDD-Ca. Apesar de não observarmos diferença estatística no conteúdo de calcitriol muscular entre os diferentes grupos (Figuras 21B e 21D), em EDL houve aumento na concentração de CYP27B1 (Figura 21A) em M-VDD, M-VDD-Ca e F-VDD-Ca, e em soleus apenas no grupo M-VDD (Figura 21C).

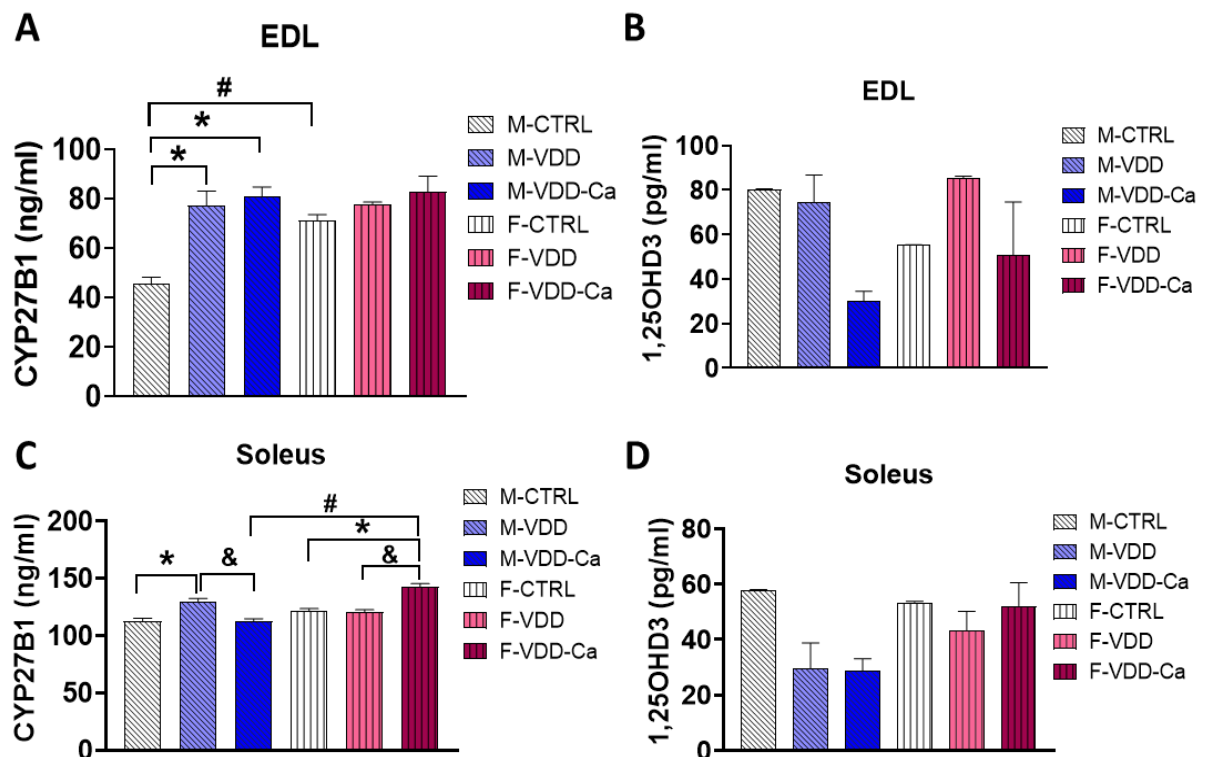


Figura 21: Quantificação de CYP27B1 e calcitriol nos músculos EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D sem (VDD) e com suplementação de Ca^{+2} (VDD-Ca), aos 21 dias de vida. Os dados estão expressos como média ± SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL; & $p < 0,05$ versus dieta VDD e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

4.3 Resultados dos filhotes de 180 dias

4.3.1 Parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais na prole de 180 dias

Com relação à prole aos 180 dias, verificou-se que os grupos M-VDD e F-VDD apresentaram concentrações séricas de calcidiol significativamente menores que os seus respectivos controles. Note-se, entretanto, que estes valores reduzidos de calcidiol são maiores do que os detectados no soro de animais VDD aos 21 dias. Para excluir os efeitos indiretos da dieta VDD no metabolismo mineral, o Ca^{+2} sérico e o PTH também foram dosados, mas não apresentaram alterações (**Tabela 6**). Em função disto, não foi necessário a inclusão do grupo de animais adultos filhotes de mães VDD suplementadas com Ca^{2+} .

Os grupos M-VDD e F-VDD pesaram menos que os seus respectivos controles no primeiro mês de vida, o que mostra a continuidade do atraso no crescimento corporal já constatado nos filhotes de 21 dias. Porém, os grupos VDD recuperaram o peso corporal no segundo mês de idade e permaneceram sem diferença de peso em relação aos seus controles, até o final do experimento (**Figura 22**). Apesar do peso corporal semelhante aos seus controles de 180 dias, o grupo M-VDD apresentou maior adiposidade corporal, a qual foi avaliada pelo peso do TAB epididimal (21 %) e retroperitoneal (35 %), sem alteração na massa dos músculos esqueléticos. Além disso, esse grupo desenvolveu hiperinsulinemia sem alterações da glicemia. Esses parâmetros não foram alterados no grupo das fêmeas (**Tabela 6**).

Tabela 6: Efeito da deficiência materna de Vit. D (VDD) nos parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais da prole de machos e fêmeas aos 180 dias

	Macho-CTRL	Macho-VDD	Fêmea-CTRL	Fêmea-VDD
Calcidiol sérico (ng/ml)	40±2	23±1*	36±0,9	23±2*
Ca ²⁺ sérico (mmol/L)	2±0,003	2±0,02	2±0,01	2±0,02
PTH (pg/ml)	122±30	86±22	98±16	104±12
Glicemia (mg/dL)	90±2	88±5	88±10	93±8
Insulina (ng/ml)	3±0,8	6±0,5*,#	3±0,09	3±0,03
Peso corporal (g)	432±9 #	421±12 #	234±3	250±4
TAB epidimal (g/100 g peso)	1,9±0,1	2,3±0,1 *	-	-
TAB periovariano (g/ 100 g peso)	-	-	2±0,3	1,9±0,06
TAB retroperitoneal (g/100 g peso)	1,4±0,1 #	1,9±0,7 *,#	0,79±0,06	0,81±0,04
EDL (mg/100 g peso)	44±0,8	42±1 #	45±1	46±0,9
Soleus (mg/100 g peso)	39±1	37±2	38±2	38±0,9

Ca²⁺: cálcio; PTH: Hormônio da paratireoide; TAB: tecido adiposo branco e EDL: *extensor digitorum longus*. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 versus dieta CTRL; & p<0,05 versus VDD e # versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental.

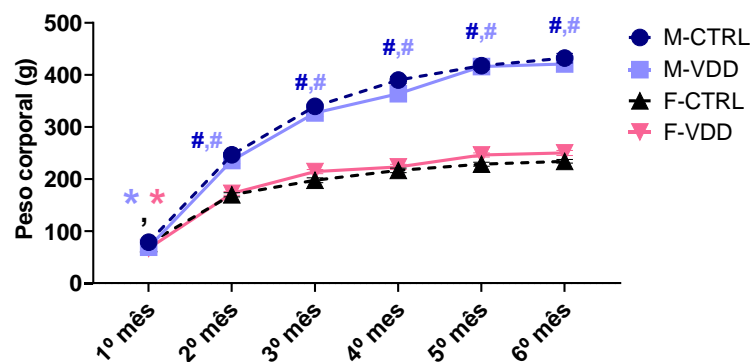


Figura 22: Curva de crescimento corporal da prole de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD) do primeiro ao sexto mês de idade. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p<0,05 versus dieta CTRL e # versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental.

4.3.2 Fenótipo muscular da prole aos 180 dias

A imunofluorescência para MHC nos músculos EDL e soleus do grupo M-VDD mostrou alterações no fenótipo muscular que variaram de acordo com o tipo de fibra muscular e o sexo do animal (**Figura 23A**). A hipoplasia em EDL observada aos 21 dias no grupo M-VDD permaneceu aos 180 dias (redução de 20 %; **Figura 23B**) e foi acompanhada por um aumento na área das fibras do tipo MHC-IIA (19 %), MHC-IIAX (21 %) e MHC-IIB (17 %) (**Figura 23C**), melhor visualizada pelo deslocamento das curvas de distribuição da frequência de áreas para a direita (**Figuras 23D e 23E**). O músculo soleus de M-VDD não mostrou alteração no número de fibras musculares totais (**Figura 23F**), como também já observado aos 21 dias, mas houve aumento na CSA das fibras do tipo MHC-IIA (32 %) (**Figuras 23G, 23H e 23I**), indicando que a hipertrofia muscular resultante da VDD materna em ratos adultos machos é restrita às fibras do tipo II. Assim como aos 21 dias, nenhuma alteração nos músculos das fêmeas de 180 dias foi observada.

Resultados: filhotes de 180 dias

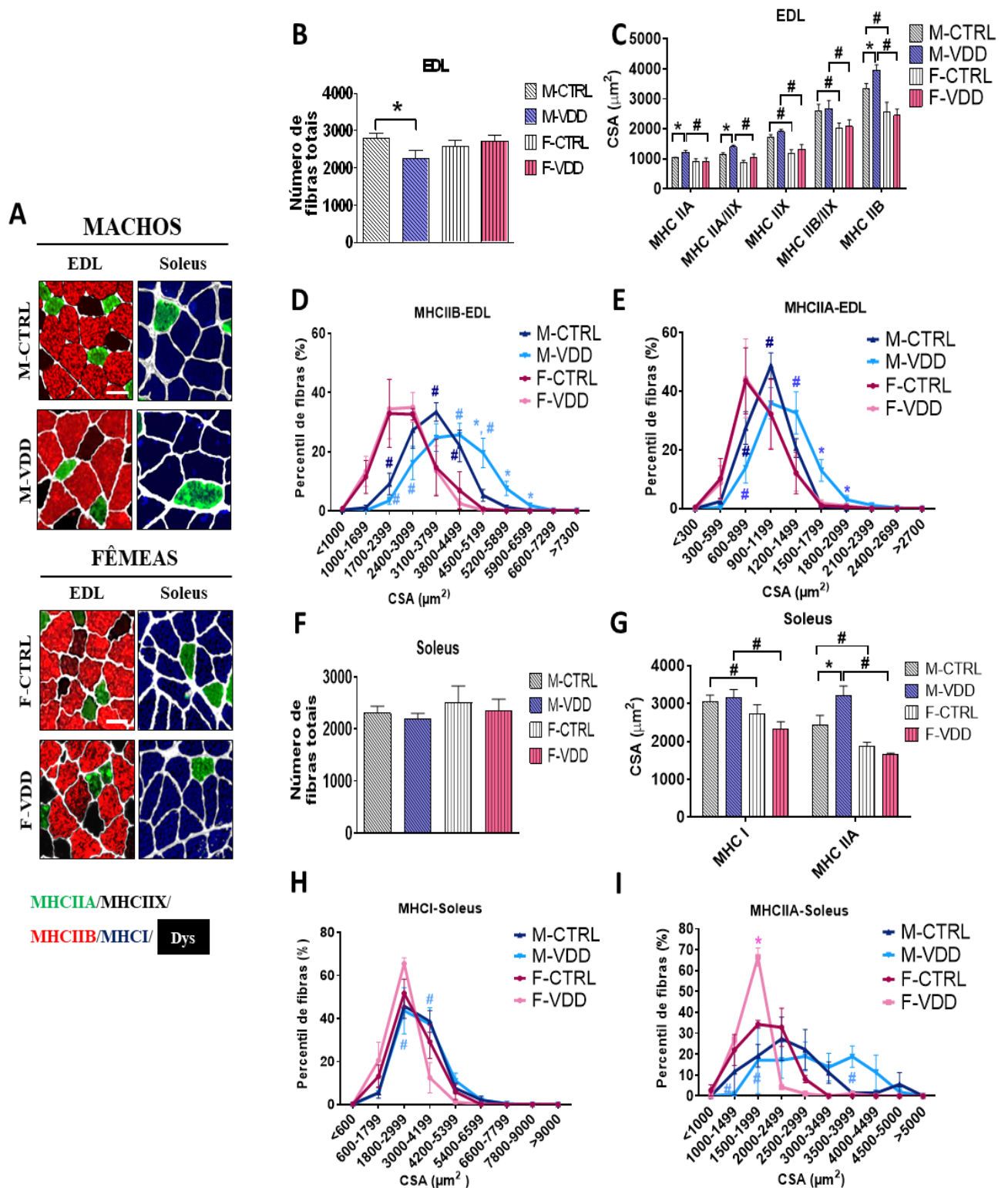


Figura 23: Imagens representativas da imunolocalização de miosina de cadeia pesada (MHC) dos músculos EDL e soleus dos grupos de machos e fêmeas, controles (CTRL; painel superior) e deficientes em Vit. D (VDD; painel inferior), aos 180 dias de vida (A). Número total de fibras musculares do EDL (B), média de áreas transversais (C) e histograma de frequência de fibras MHC-IIB e MHC-IIA (D e E,

respectivamente). Número total de fibras musculares do soleus (F), média de áreas transversais (G) e histograma de frequência de fibras MHC-I e MHC-IIA (H e I, respectivamente). Barra de escala, 50 μ m. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

Em função do aumento da CSA das fibras de contração rápida no EDL e soleus do grupo M-VDD, procedeu-se a imunolocalização das fibras e a marcação dos seus núcleos para investigar se a hipertrofia era acompanhada por hipernuclearidade. Verificou-se que todas as fibras do músculo EDL que apresentaram aumento na CSA também apresentaram aumento do número de núcleos (MHC-IIA [24 %], MHC -IB [13 %] e MHC-IIX [18 %]) (**Figuras 24A, 24B e 24C**). Um efeito semelhante foi observado nas fibras musculares MHC-IIA (26 %) no soleus. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no número de núcleos centrais dos músculos EDL e soleus (**Figura 24D e 24E**).

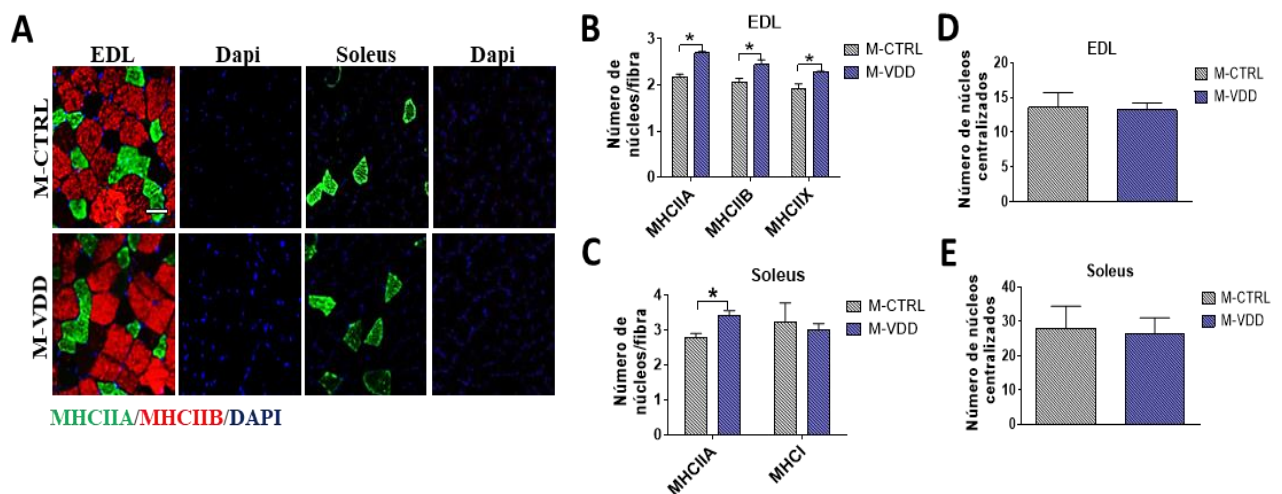


Figura 24: Imagens representativas da imunolocalização de miosina de cadeia pesada (MHC) e Dapi em EDL e soleus de machos (M) controles (CTRL; painel superior) e deficientes em Vit. D (VDD; painel inferior), aos 180 dias de vida (A). Análise quantitativa do número de núcleos/fibra e núcleos centrais em EDL (B e D, respectivamente) e soleus (C e E, respectivamente). Barra de escala, 50 μ m. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL (n=6).

Em relação à análise da transição de tipo de fibra, observou-se somente uma maior proporção de fibras MCH-IIB em F-CTRL em comparação ao M-CTRL no músculo EDL (**Figura 25**).

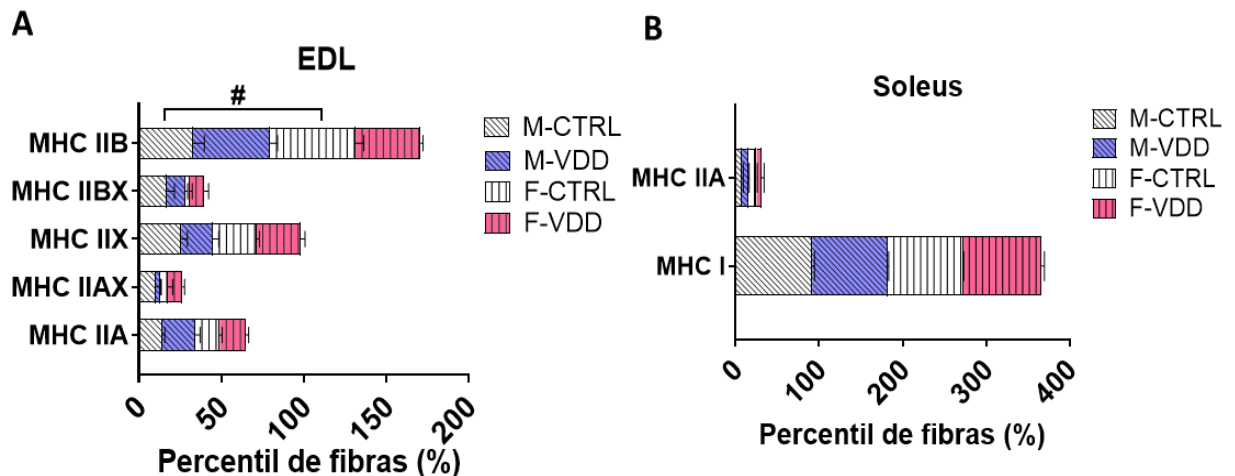


Figura 25: Percentil dos diferentes tipos de fibras no músculo EDL (A) e soleus (B) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

Em resumo, a análise do fenótipo muscular da prole aos 180 dias demonstrou que os animais do grupo M-VDD reverteram a atrofia muscular severa observada em EDL e soleus aos 21 dias de vida e desenvolvem hipertrofia seletiva das fibras glicolíticas, principalmente em EDL, com aumento de núcleos nessas células. Além disso, todas essas alterações são sexo-específicas uma vez que o grupo F-VDD, mesmo apresentando concentrações de Vit. D semelhantes ao grupo M-VDD, não apresentou alterações musculares em nenhum dos tempos estudados.

4.3.3 Alterações no número de CSs e da miogênese na prole de 180 dias

O aumento do volume celular (hipertrofia) normalmente é acompanhado por um aumento proporcional no número de mionúcleos e esse processo se deve à diferenciação e fusão de CSs que doam seus núcleos para a fibra muscular. Para desvendar os mecanismos celulares subjacentes à hipertrofia e hipernuclearidade induzidas pela VDD materna em ratos machos, investigou-se se esta resposta anabólica estava relacionada à proliferação e diferenciação de CSs musculares por meio da imunomarcagem de Pax7 e a expressão proteica e gênica dos MRFs.

O VDD materno aumentou significativamente o número de núcleos positivos para Pax7 no músculo EDL (41 %; **Figuras 26A e 26B**) sem afetar o soleus (**Figuras 26C e 26D**). Portanto, esse aumento na proliferação de CSs poderia explicar a hipernuclearidade das fibras musculares e a consequente hipertrofia desses animais.

A análise dos MRFs mostrou um conteúdo proteico de MyoD maior no músculo EDL do grupo M-VDD em relação ao M-CTRL (73 %; **Figuras 26E e 26F**). A VDD materna induziu ainda aumento no conteúdo de miogenina em ambos os músculos, EDL (55 %) e soleus (5 vezes), (**Figuras 26G e 26H**) indicando ativação da diferenciação miogênica. Nenhuma mudança no número de núcleos positivos para Pax7 nos músculos das fêmeas foi observada, enquanto a expressão de MRFs nesses músculos foi muito baixa ou até mesmo indetectável. A expressão gênica dos MRFs também foi analisada (**Figuras 26I e 26J**) e não apresentou qualquer alteração, exceto uma redução de *MyoD* em EDL do grupo M-VDD.

Portanto, esses dados mostram que a VDD materna promoveu hipertrofia seletiva nas fibras musculares de contração rápida do músculo EDL da prole de machos e isso foi acompanhado pela proliferação de CSs e da diferenciação miogênica.

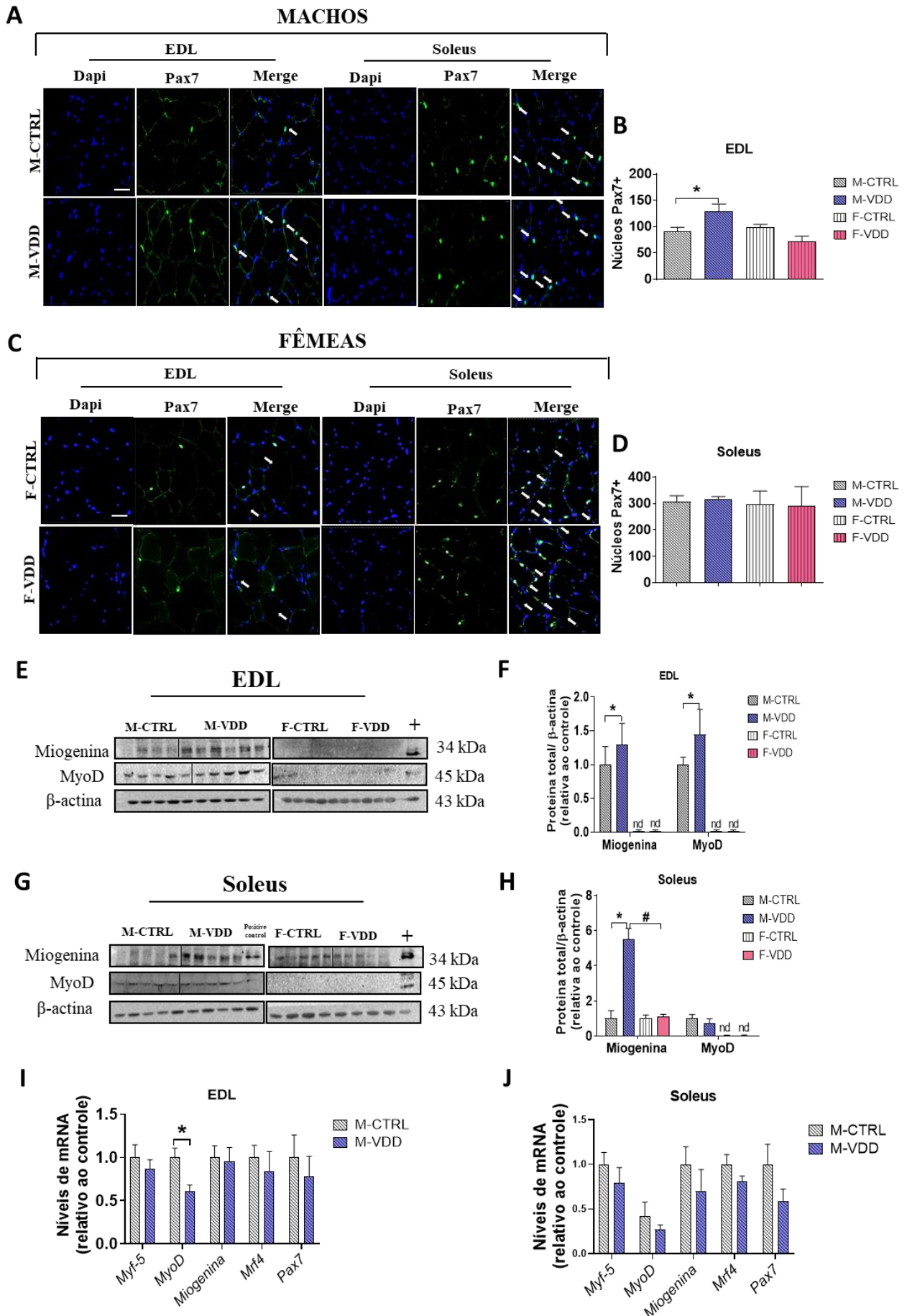


Figura 26: Imunolocalização de células satélites (Pax 7) e análise quantitativa do número de núcleos positivos para Pax7 em EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. As setas mostram os núcleos Pax 7+. Conteúdo proteico e análise densitométrica de miogenina e MyoD nos músculos EDL (E e F, respectivamente) e soleus (G e H, respectivamente). Expressão gênica dos diferentes fatores regulatório miogênicos e de Pax-7 em EDL (I) e soleus (J) dos grupos de machos CTRL e VDD. +: controle positivo com células C2C12. nd: não detectado. Barra de escala, 50 μ m. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

4.3.4 Alterações do metabolismo de proteínas em músculos da prole de 180 dias

A síntese de proteínas estimada pelo método SUnSET *in vivo* (Figuras 27A, 27B e 27C) e a atividade do proteassoma (Figuras 27D e 27E) não foram afetadas pela VDD materna, tanto em músculos EDL como em soleus da prole masculina e feminina. Em EDL, observou-se maior atividade do proteassoma em fêmeas CTRL e VDD quando comparadas aos machos do mesmo grupo experimental (Figura 27D).

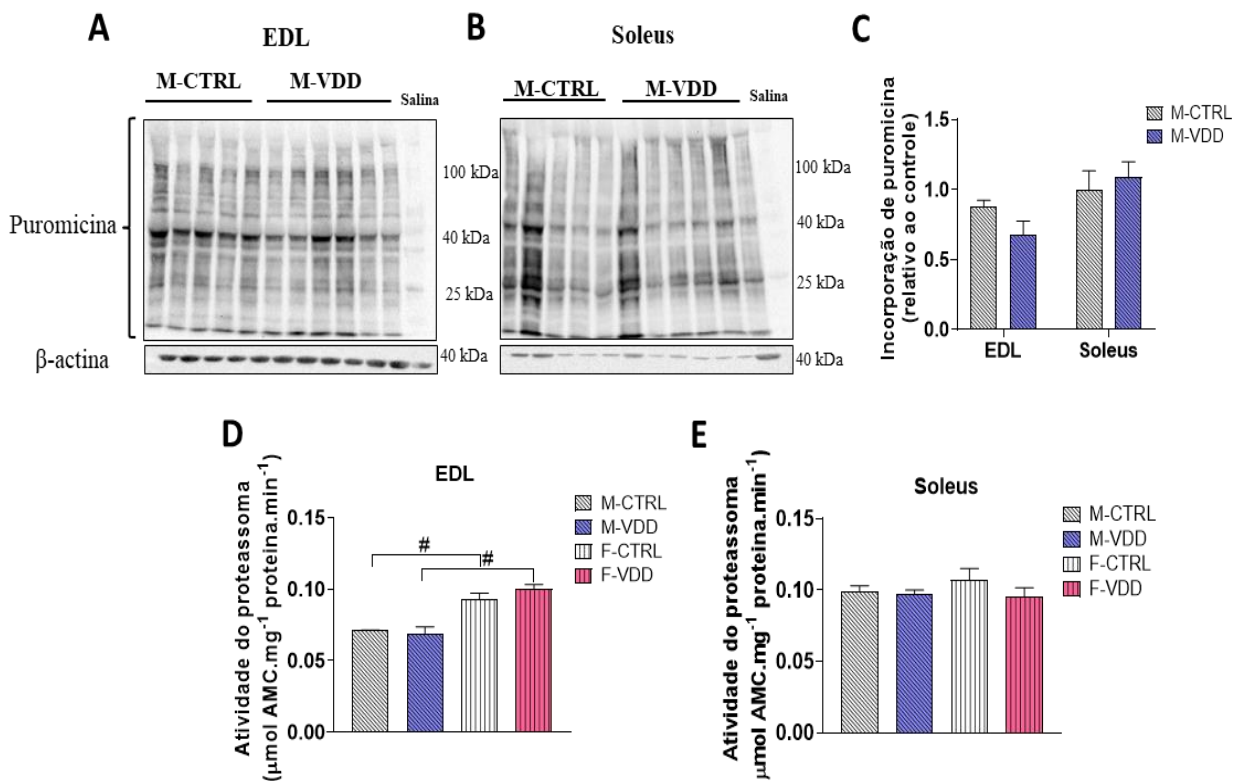


Figura 27: Imagem representativa da técnica de Western blot e análise densitométrica de proteínas recentemente sintetizadas (que incorporaram puromicina) nos músculos EDL e soleus (A, B e C) dos grupos de machos (M) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Atividade do proteossoma dos músculos EDL (D) e soleus (E) dos grupos de machos e fêmeas CTRL e VDD. Os dados estão expressos como média \pm SEM. # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental (n=6).

4.3.5 Vias de sinalizações relacionadas ao metabolismo de proteínas musculares da prole de 180 dias

Para investigar as vias de sinalizações envolvidas no efeito hipertrófico das fibras glicolíticas em músculo EDL do grupo M-VDD, o conteúdo e estado de fosforilação do receptor de IGF-1/Insulina e diferentes alvos *downstream* da insulina relacionados à síntese de proteínas foram analisados. Em EDL, o grupo M-VDD apresentou aumento no conteúdo do receptor de Insulina-IGF-1 (52 %), Tyr⁹⁸⁹ p-IRS1 (56 %), Ser⁴⁷³ p-Akt (33 %) e Ser^{21/9} p-GSK-3 β (100 %; **Figuras 28A e 28B**), assim como no conteúdo de Glut 4 (60%; **Figura 28C**) e na expressão de *Igf-1* (76%; **Figura 28F**) quando comparado ao respectivo controle. Curiosamente, nenhuma dessas alterações foi encontrada no soleus de M-VDD (**Figuras 28D e 28E**). De forma semelhante aos animais jovens, não se observou alterações na sinalização de mTOR e seus alvos a jusante (Ser^{235/236} p-S6 e Thr⁷⁰ p-4E-BP1) em nenhum dos músculos estudados (**Figuras 29A, 29B, 29C e 29D**), o que sugere que a hipertrofia das fibras glicolíticas induzida pela VDD materna ocorre de uma forma independente da via de sinalização de mTOR.

Foi analisada também a expressão gênica de alguns reguladores negativos da massa muscular esquelética como a *atrofina-1*, *Murf-1* e *miostatina* (**Figuras 29E, 29F, 29G e 29H**), assim como proteínas (p-Smad2 e p-Smad3) relacionadas à via da miostatina (**Figura 29B e 29D**) mas não se observou qualquer alteração desses parâmetros em nenhum dos grupos analisados.

Em conjunto, esses resultados mostram que a hipertrofia das fibras glicolíticas induzida por VDD da prole masculina ocorre concomitantemente com a ativação do programa miogênico

e da sinalização da via de Insulina-IGF-1 nos músculos EDL sem alterações aparentes nas vias de degradação proteica.

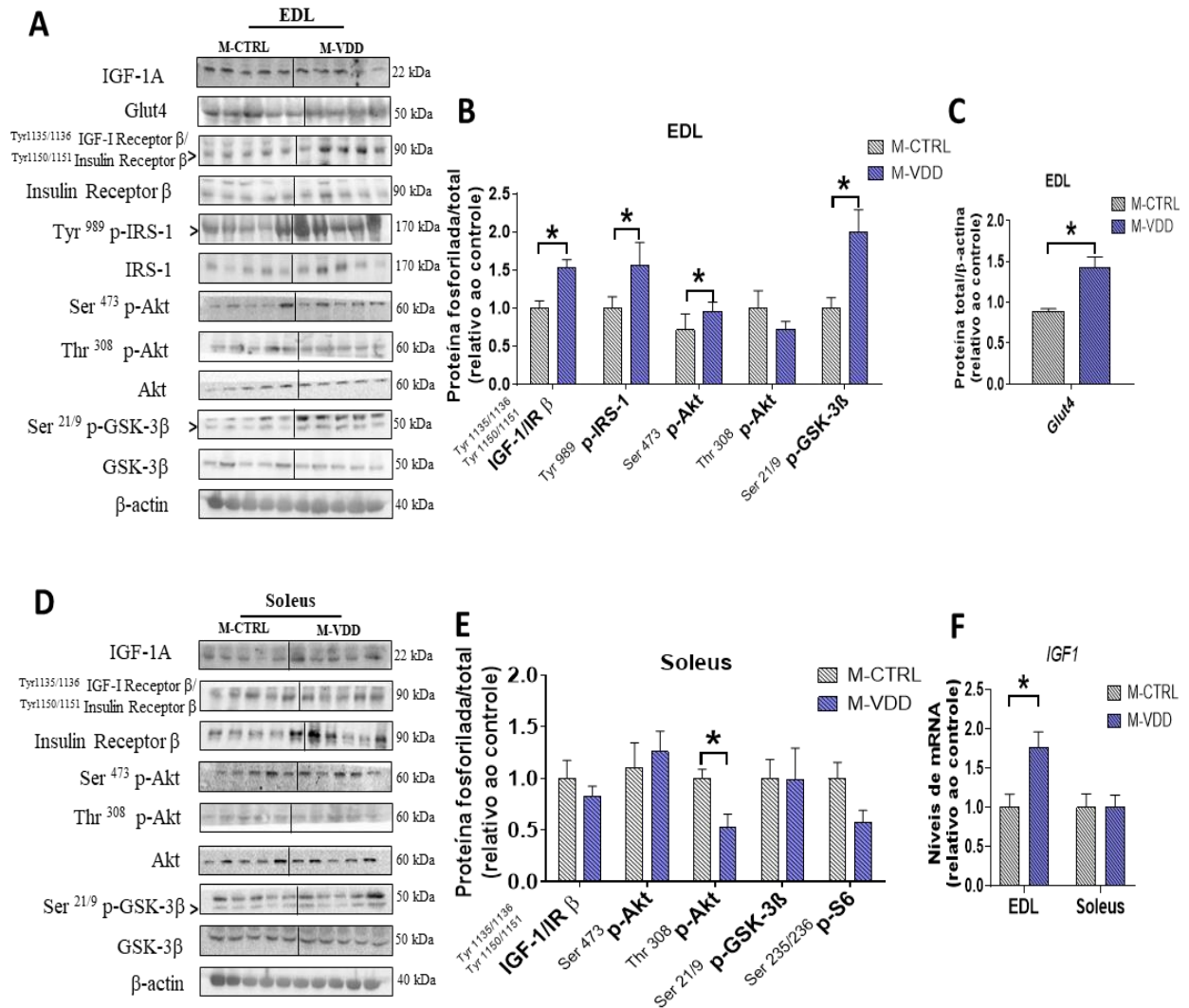


Figura 28: Imagens representativas da técnica de Western blot, análise densitométrica de proteínas fosforiladas e totais relacionadas à síntese de proteínas e miogênese nos músculos EDL (A, B e C, respectivamente) e soleus (D e E, respectivamente) dos grupos de machos (M) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Expressão relativa de *Igf-1* nos músculos EDL e soleus (F). Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL (n=6).

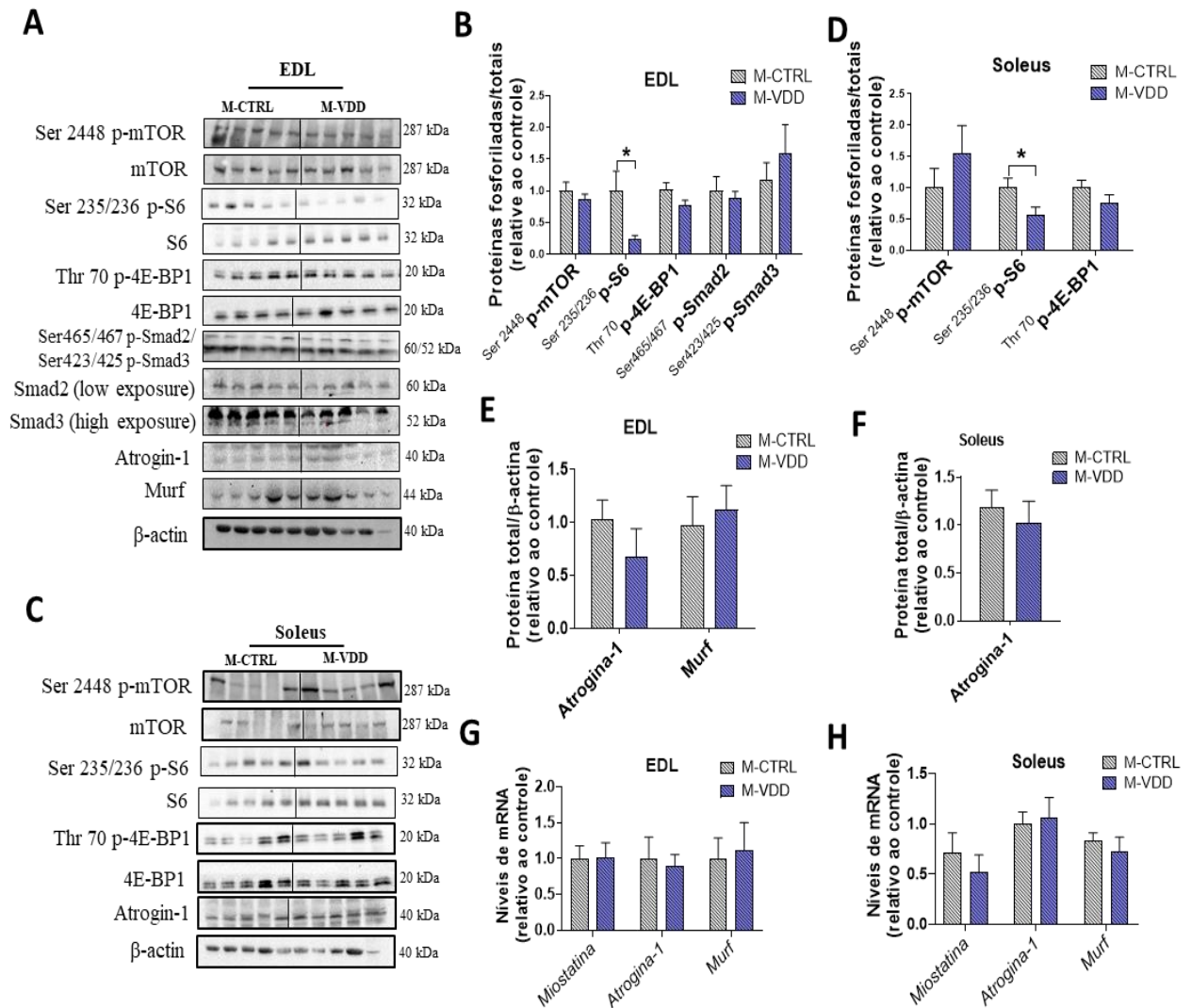


Figura 29: Imagens representativas da técnica de Western blot, análise densitométrica de proteínas fosforiladas e totais relacionadas à síntese e degradação de proteínas nos músculos EDL (A, B e E, respectivamente) e soleus (C, D e F, respectivamente) dos grupos de machos (M) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Expressão relativa de *Miostatina*, *Atrogin-1* e *Murf* nos músculo EDL (G) e soleus (H). Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL (n=6).

4.3.6 Função contrátil no músculo EDL e soleus da prole de ratos machos aos 180 dias

Considerando que os músculos EDL de M-VDD desenvolvem hipertrofia, tornou-se interessante investigar o efeito da VDD materna na função contrátil em EDL e soleus. Consistente com o impacto positivo da VDD na CSA das fibras de contração rápida, músculos EDL do grupo M-VDD apresentaram aumento na força tetânica específica, durante o protocolo

de fadiga e na força específica máxima pós-fadiga (76 % versus M-CTRL), indicando resistência à fadiga (**Figuras 30A e 30B**). Além disso, a atividade da citrato sintase, um indicador da biogênese mitocondrial, aumentou no músculo EDL do grupo M-VDD (**Figura 30E**). Ao contrário do EDL, músculos soleus do grupo M-VDD apresentaram menor força específica máxima nas condições pré e pós-fadiga (27 % e 61 %, respectivamente, versus M-CTRL), bem como diminuição na produção de força, durante a indução à fadiga, indicando um comprometimento funcional severo nesse músculo (**Figuras 30C e 30D**).

Em conjunto, esses resultados mostram que a hipertrofia das fibras glicolíticas do EDL da prole masculina adulta, induzida pela VDD materna, é acompanhada por aumento da resistência à fadiga muscular. Apesar do músculo soleus não ter sua morfologia alterada de forma importante, sua função contrátil e resistência à fadiga são severamente prejudicadas pela VDD materna.

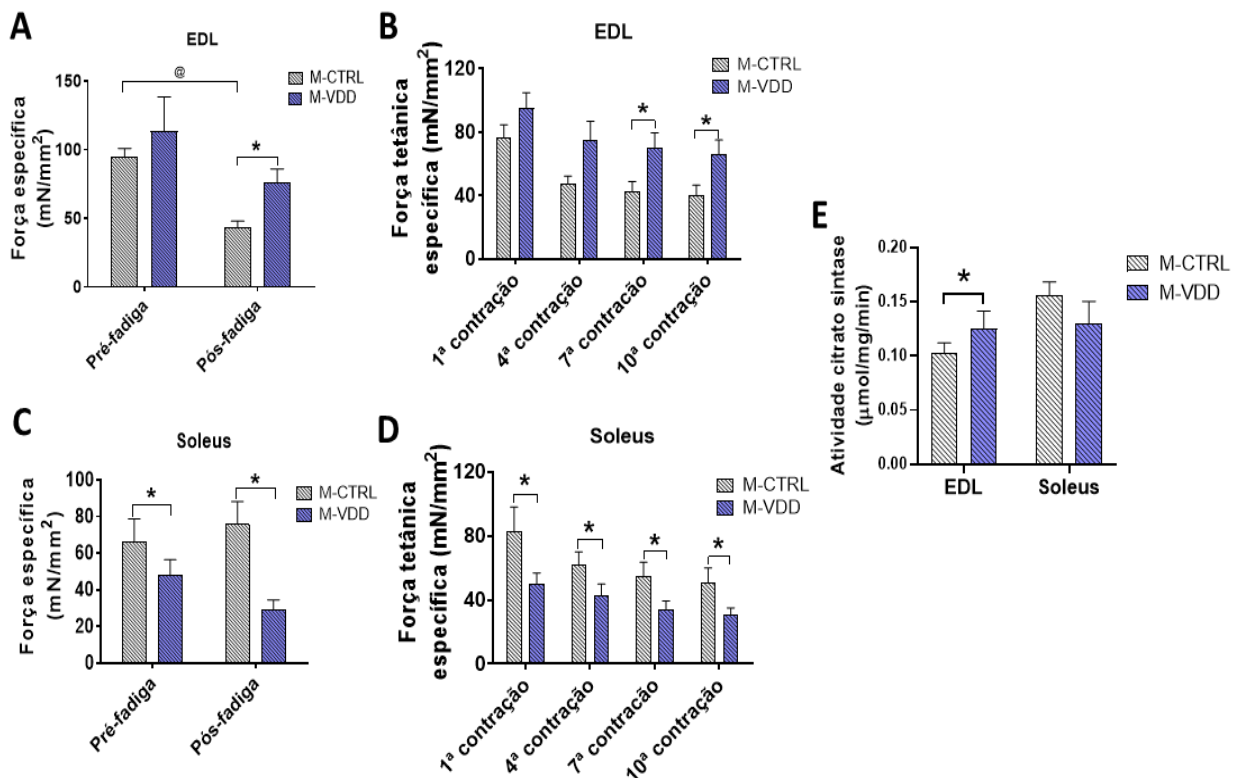


Figura 30: Forças específicas máximas pré e pós-fadiga e as forças tetânicas específicas do músculo EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos de machos (M) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Atividade da citrato sintase em EDL e soleus (E). Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL e @ $p < 0,05$ versus pós-fadiga (n=6).

4.3.7 Metabolismo local de Vit. D no músculo esquelético da prole aos 180 dias

Em seguida, investigou-se se a produção local de calcitriol poderia ou não ser responsável pelos efeitos diferenciais induzidos pela VDD na morfologia e função dos músculos EDL e soleus de machos e fêmeas. Inicialmente, foi analisado como as concentrações de calcitriol e CYP27B1 variavam entre os dois tipos de músculo. Em ambos os sexos, verificou-se que o conteúdo de calcitriol é muito maior (10 vezes) no EDL em comparação com os músculos soleus de animais controles e que a concentração de CYP27B1 é maior em soleus quando comparado ao EDL.

A VDD materna induziu um aumento compensatório no conteúdo muscular de calcitriol (2 vezes) e CYP27B1 (58 %) no EDL de machos (**Figuras 31A e 31B, respectivamente**), sem que houvesse qualquer alteração nas fêmeas. No músculo soleus, os valores de calcitriol e CYP27B1 de M-VDD permaneceram semelhantes aos de M-CTRL (**Figuras 31C e 31D, respectivamente**).

Esses dados mostram que o metabolismo de Vit. D é mais ativo em EDL do que em soleus e sugere que mecanismos adaptativos na geração local desse hormônio no músculo EDL do animal adulto, podem explicar as diferenças histológicas e funcionais observadas entre esses músculos.

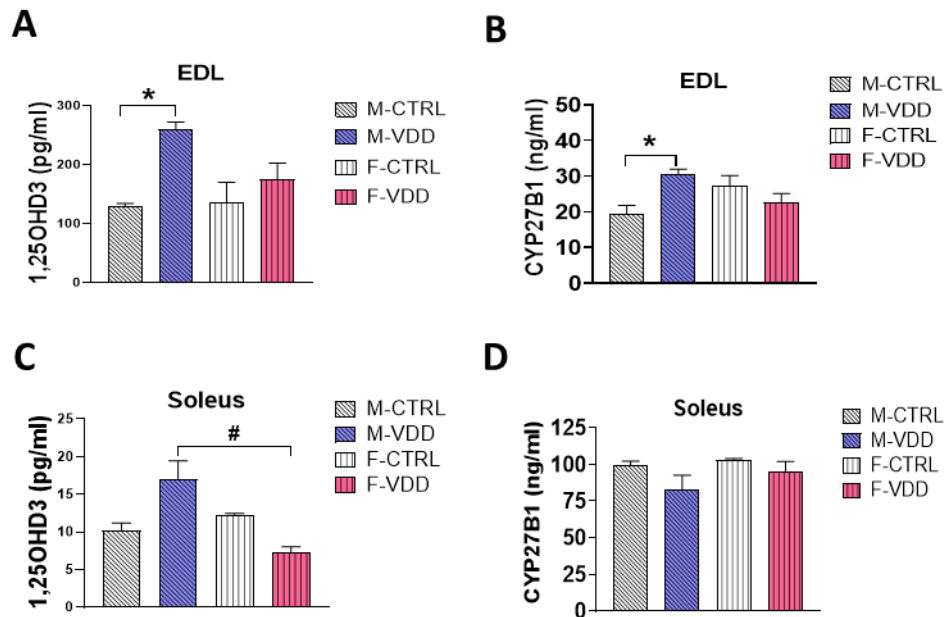


Figura 31: Concentração intramuscular de CYP27B1 e calcitriol em EDL (A e B, respectivamente) e soleus (C e D, respectivamente) dos grupos de machos (M) e fêmeas (F) controles (CTRL) e deficientes em Vit. D (VDD), aos 180 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus dieta CTRL e # $p < 0,05$ versus machos e fêmeas dentro do mesmo grupo experimental ($n=6$).

Discussão



5 DISCUSSÃO

O principal objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da VDD, durante a gestação e a lactação, na morfologia, metabolismo e função contrátil de diferentes músculos esqueléticos da prole de ratos machos e fêmeas, na infância e vida adulta. Para isso, foi utilizado um modelo experimental de programação fetal de VDD sendo a eficiência comprovada por meio da redução das concentrações séricas de calcidiol tanto nas mães como na prole. Como esperado, a hipovitaminose D induzida pela dieta causou hipocalcemia, o que levou ao aumento do PTH sérico na prole de 21 dias. Portanto, para dissociar o efeito da deficiência de Vit. D de suas alterações do metabolismo do Ca^{+2} , um grupo de mães foi suplementado com Ca^{+2} e isso foi capaz de normalizar as concentrações de Ca^{+2} e PTH na prole.

Uma das principais dificuldades encontradas, durante a padronização de nosso modelo, foi a redução do sucesso reprodutivo das ratas de ambos os grupos VDD (sem ou com suplementação). O trabalho de Halloran & Deluca (1980) foi um dos primeiros a demonstrar que, embora a Vit. D não seja absolutamente necessária para a reprodução, na sua ausência, a fertilidade em fêmeas é reduzida em 75 %, o tamanho das ninhadas é reduzido em 30 % e o crescimento neonatal é atrasado (HALLORAN; DELUCA, 1980). Todos esses achados foram confirmados no presente trabalho, que também demonstrou que apesar da normalização da calcemia reverter os efeitos da VDD na mortalidade materna, o mesmo não aconteceu no sucesso reprodutivo, número da ninhada e crescimento fetal. Isso demonstra o papel da Vit. D não só em processos que envolvem a reprodução, mas também na saúde, crescimento e desenvolvimento da prole.

Ao longo dos últimos anos, a importância fisiológica da Vit. D na reprodução humana tem ganhado muita evidência, de tal forma que alguns trabalhos já relacionam a concentração sérica de calcidiol ao sucesso de gravidez em mulheres submetidas à reprodução assistida. Sabe-

se, por exemplo, que mulheres com VDD apresentam uma taxa de gravidez clínica mais baixa em comparação àquelas com níveis normais de Vit. D (ABADIA *et al.*, 2016; POLYZOS *et al.*, 2014). Além de modular a esteroidogênese ovariana (WOJTUSIK; JOHNSON, 2012), a Vit. D pode contribuir para a restauração do ciclo menstrual e proliferação endometrial (ASADI *et al.*, 2014; WEHR; PIEBER; OBERMAYER-PIETSCH, 2011), desenvolvimento de folículos ovarianos (OTT *et al.*, 2012), melhora da dismenorreia primária (LASCO, 2012) e redução na ocorrência de miomas uterinos (WISE *et al.*, 2014). Grande parte dessas funções provavelmente é mediada pelo VDR (JOHNSON, L. E.; DELUCA, 2001), que se encontra presente em muitos tecidos com funções reprodutivas como, por exemplo, ovários, útero, testículos e placenta (KINUTA *et al.*, 2000).

Além de causar prejuízo no processo reprodutivo, ambos os grupos de ratas virgens VDD de nosso estudo apresentaram hiperglicemia, o que sugere alterações na tolerância à glicose nesses animais. Trabalhos anteriores já inferiram que o papel regulatório da Vit. D na homeostase da glicose se dá por meio de suas ações indiretas no pâncreas. Há evidências da presença de VDR e da enzima CYP27B1 nas células pancreáticas (BLAND *et al.*, 2004; JOHNSON, J. A. *et al.*, 1994) e o VDRE já foi identificado no promotor do gene da insulina humana (MAESTRO, Begoña *et al.*, 2003). Além disso, a Vit. D é capaz de ativar diretamente a transcrição do gene do receptor de insulina humano (MAESTRO, Begoña *et al.*, 2002) e aumentar a secreção de insulina de células β - pancreáticas *in vitro* (BORNSTEDT *et al.*, 2019).

Embora não tenhamos acompanhado a glicemia das ratas durante a gravidez, é possível que os filhotes tenham sido gerados em um ambiente hiperglicêmico. De fato, há evidências de uma relação inversa entre as concentrações circulantes de Vit. D e o desenvolvimento do diabetes mellitus (DM) gestacional (DMG). Outros estudos também demonstraram que a VDD, durante a gravidez, está associada a um risco aumentado de DMG (ARNOLD *et al.*, 2015; WEN, J *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2008) e que a suplementação de Vit. D nessas pacientes

em efeitos benéficos na glicose plasmática em jejum e nos níveis séricos de insulina (RAJABI-NAEENI *et al.*, 2020; SHAHGHEIBI; FARHADIFAR; POUYA, 2016). Além dos efeitos deletérios para a mãe, foi relatado que a hiperglicemia gravídica, aumenta o risco de complicações metabólicas e cardíacas na prole (BIANCO; JOSEFSON, 2019). A associação de hiperglicemia *in utero* com a programação fetal foi descrita, pela primeira vez, na população de nativos americanos Pima, entre os quais foi encontrada uma alta prevalência de obesidade e DM tipo 2 (PETTITT *et al.*, 1983, 1988).

A VDD é comum entre mulheres grávidas e tem sido associada a um risco elevado de outras complicações na gravidez, como pré-eclâmpsia e uma série de problemas de saúde graves a curto e a longo prazo na prole (BODNAR *et al.*, 2007; IDERAABDULLAH *et al.*, 2019). Apesar de nosso estudo ter focado nas repercussões da VDD materna na prole e não na mãe, os nossos resultados demonstram a importância da Vit. D na fertilidade feminina, no sucesso da gestação e na saúde materna.

5.1 Efeitos da VDD materna na prole infantil

Com relação aos efeitos da VDD materna na prole de 21 dias, os principais achados foram os seguintes: 1) Os músculos EDL e soleus de machos desenvolvem atrofia associada à hipoplasia (em EDL), redução da síntese proteica (em soleus) e ativação de vias proteolíticas dependentes de Ca^{+2} e do processo de ubiquitinação (em EDL); 2) Esses efeitos podem ser decorrentes da falta da ação muscular da Vit. D e/ou da hipoinsulinemia secundária; 3) A normalização dos níveis de Ca^{+2} e PTH nos machos não reverte as baixas concentrações de insulina, mas exacerba a ativação das calpaínas agravando ainda mais a atrofia e, especificamente em EDL, ativa a PKC e inativa a via da Insulina-IGF-1/Akt; 4) Em paralelo, a suplementação com Ca^{+2} promove estímulo da síntese proteica, em ambos os músculos e melhora a sinalização da Insulina-IGF-1/Akt em soleus; 5) A prole feminina não desenvolve

hipoinsulinemia e não apresenta nenhuma alteração na morfologia dos músculos EDL e soleus; 6) O conteúdo de calpaína-2 (em EDL) também é aumentado nas fêmeas, mas a síntese proteica e a sinalização de Insulina-IGF-1/Akt (em soleus) são amplificadas em resposta à suplementação materna com Ca^{+2} e 7) As fêmeas *down*-regulam marcadores negativos da massa muscular tais como atrogina-1 (em EDL e soleus), *miostatina* (em soleus) e a atividade do proteassoma (em tibial anterior de F-VDD).

Apesar da VDD materna não ter interferido no peso da prole ao nascimento, M-VDD e M-VDD-Ca apresentaram atraso no crescimento no período de desmame, sendo esse efeito associado à hipoplasia e atrofia muscular, redução da massa do TAB epididimal e retroperitoneal e hipoinsulinemia. Estudos realizados em mulheres indicam que mães com Vit. D menor que 20 ng/ml possuem maior probabilidade de ter filhos com baixo peso ao nascer do que aquelas com níveis maiores de Vit. D (HUANG *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2018). São vários os mecanismos atribuídos à associação do nível de Vit. D da mãe e seus efeitos no crescimento fetal (FANG *et al.*, 2021). Dentre esses, pode-se destacar os seus efeitos clássicos na mineralização óssea (KHALESSI *et al.*, 2015), no aumento de glicocorticoides maternos (TESIC *et al.*, 2015), na secreção hepática de IGF-1 e expressão de receptores de IGF-1 em vários tecidos (AMERI *et al.*, 2013; BOGAZZI *et al.*, 2011; MATILAINEN, 2005). Um estudo anterior (MAIA-CECILIANO *et al.*, 2016), utilizando o mesmo protocolo de VDD materna em camundongos, mostrou um desenvolvimento anormal do pâncreas da prole masculina adulta aos 90 dias. Como consequência, esses animais apresentavam hipoinsulinemia associada à redução do PDX-1 (*pancreas/duodenum homeobox-1*), um fator de transcrição essencial para o crescimento e função das células β -pancreáticas (MAIA-CECILIANO *et al.*, 2016). É provável que o mesmo esteja acontecendo com os filhotes machos do nosso estudo, o que explica a redução nas concentrações séricas de insulina e a consequente redução do tecido adiposo branco, muito provavelmente resultante da ativação da lipólise e redução da lipogênese.

A hipoplasia observada na prole masculina deficiente foi também relatada em outros estudos e indica uma anormalidade do crescimento muscular induzida pela VDD materna. O número de fibras musculares é estabelecido no meio intra-uterino e depende de um balanço de fatores proliferativos e antiproliferativos. Por exemplo, foi demonstrado que os IGFs atuam como fatores de proliferação e diferenciação em células fetais cultivadas (BHAUMICK; BALA, 1991; LORENZO *et al.*, 1993) e em embriões pré-implantados (HARVEY; KAYE, 1992). O mecanismo subjacente proposto para o atraso no crescimento de camundongos IGF-1-KO e IGF-2-KO é que a deleção desses fatores parácrinos e hormonais leva ao alongamento do ciclo celular, resultando em prejuízos da proliferação de tecidos e na geração de um menor número de células diferenciadas no embrião (AGROGIANNIS *et al.*, 2014). Ao contrário do IGF-I, o cortisol é um hormônio com potencial antiproliferativo e induz diferenciação (AUFDENBLATTEN *et al.*, 2009; EDWARDS; BOONSTRA, 2018) que, quando está aumentado em situações de desnutrição materna como a VDD (TESIC *et al.*, 2015), age na placenta inibindo a ciclina D3 e p27Kip1 e a sinalização da via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK; AUFDENBLATTEN *et al.*, 2009) levando à hipoplasia de diferentes tecidos fetais.

Curiosamente, o efeito hipoplásico induzido pela VDD foi observado exclusivamente em músculos EDL, mas não em soleus. Nesse sentido, sabe-se que fibras do tipo II apresentam mais receptores para glicocorticoides do que fibras do tipo I (SHIMIZU *et al.*, 2011), o que poderia, em teoria, ajudar a explicar tais diferenças. Por outro lado, foi demonstrado que a suplementação materna de calcidiol em porcas grávidas aumenta o número de fibras musculares na prole (HINES *et al.*, 2013; ZHOU, H. *et al.*, 2016). Portanto, esses dados reforçam a ideia de que a Vit. D é um hormônio crucial para o crescimento muscular em útero. Futuros estudos deverão esclarecer se esta ação envolve ou não a participação de outros fatores parácrinos e/ou hormonais importantes para o crescimento fetal como os IGFs, o cortisol e a insulina.

Além da hipoplasia, machos de ambos os grupos VDD, mas não fêmeas, apresentaram atrofia em diferentes músculos glicolíticos e oxidativos. Entretanto, esse efeito foi mais severo em EDL do que em soleus e, em ambos os músculos, o grupo M-VDD-Ca foi o que desenvolveu maior atrofia. A diminuição da massa muscular observada em animais VDD está de acordo com outros estudos. Camundongos VDR-KO apresentam fibras musculares 20 % menores do que os camundongos do tipo selvagem (ENDO *et al.*, 2003). Em biópsias de músculo esquelético de humanos com VDD, verificou-se atrofia das fibras musculares predominantemente do tipo II (BOLAND, 1986). Foi demonstrado ainda que ratos adultos expostos a uma dieta VDD apresentaram redução na área das fibras do tipo II, enquanto a área das fibras do tipo I não foi alterada (BHAT, M. *et al.*, 2013), sugerindo um efeito anabólico específico da Vit. D na manutenção da massa da fibra muscular do tipo II.

Ainda não está claro na literatura se as anormalidades musculares observadas na VDD são uma consequência direta da falta da ação deste hormônio no músculo (via VDR) ou o resultado de alterações sistêmicas secundárias, como a hipocalcemia ou o PTH elevado. Estudo anterior demonstrou que a correção da hipocalcemia em aves VDD não previne os distúrbios musculares (PLEASURE *et al.*, 1979), o que indica o envolvimento de ações diretas da Vit. D no músculo. No entanto, outros demonstraram que o excesso de PTH leva à atrofia muscular e fraqueza (BACZYNSKI *et al.*, 1985).

O trabalho de Bhat *et al.* (2013) com ratos adultos VDD induzidos pela dieta, mostrou que a atrofia muscular observada no músculo epitroclear, foi acompanhada pelo aumento na degradação proteica e redução de síntese e que, enquanto a suplementação de Vit. D revertia essas mudanças, a suplementação com Ca^{+2} corrigiu-as parcialmente (BHAT, M. *et al.*, 2013). Em nosso estudo, a dieta materna suplementada com Ca^{+2} foi efetiva em normalizar os níveis de Ca^{+2} e PTH nas proles deficientes de ambos os sexos (M-VDD-Ca e F-VDD-Ca), assim como melhorou a sinalização da via de Insulina-IGF-1/Akt, conforme indicado pelo aumento

na fosforilação de IRS-1, Akt e GSK-3 β em soleus, mas não em EDL dessas proles. Em concordância com esse resultado, M-VDD-Ca apresentou um aumento da síntese proteica em EDL e soleus quando comparado a M-CTRL e M-VDD. De fato, o Ca⁺² é conhecido por desempenhar um papel na regulação de Akt. Zanou et al. (2012) demonstraram que a deleção do canal de Ca⁺² Trpc1 (*transient receptor potential type 1*) ou a inibição da entrada de Ca⁺² reduz a fosforilação de Akt e retarda a diferenciação das células musculares, sugerindo um papel do Ca⁺² na atividade da via PI3K/Akt (ZANOUE *et al.*, 2012). Em outros modelos de programação fetal de desmame precoce ou de mães expostas à nicotina, demonstrou-se que a suplementação materna ou a suplementação precoce do filhote com Ca⁺² reverte algumas alterações endócrino-metabólicas presentes nesses modelos, como adiposidade central, hiperleptinemia e resistência à insulina (NOBRE, J L *et al.*, 2011; NOBRE, J L *et al.*, 2012).

Apesar da VDD não ter afetado a sinalização da Insulina-IGF-1/Akt nas proles deficientes, a síntese proteica em soleus de M-VDD foi reduzida. Esse resultado pode ser um reflexo da hipocalcemia encontrada nesses animais. A calcineurina, uma fosfatase que é ativada pelo aumento nas concentrações de Ca⁺², tem um papel fundamental na regulação da massa muscular, participando da ativação da síntese proteica e da consequente hipertrofia muscular induzida por IGF-1 (MUSARÒ *et al.*, 1999; SEMSARIAN *et al.*, 1999). Sendo a calcineurina mais ativa em fibras lentas do que fibras rápidas (HUDSON; PRICE, 2013), é razoável se constatar que a hipocalcemia tenha reduzido a síntese proteica de forma mais evidente em soleus e não em EDL.

Ao contrário dos efeitos estimulatórios da suplementação com Ca⁺² na sinalização da Insulina-IGF-1/Akt em soleus, os resultados mostram que esta sinalização foi reduzida em EDL. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar estas diferenças. Foi observado nesse trabalho que somente em EDL houve aumento de substratos fosforilados de PKC. Há evidências de que a quantidade de PKC- θ em EDL é 10 vezes maior do que a encontrada em

soleus (JANI *et al.*, 2021). Estudos anteriores demonstraram que a ativação de PKCs com acetato de forbol causa resistência à insulina (HÄRING *et al.*, 1986; KARASIK *et al.*, 1990) e que PKCs são ativadas em modelos de roedores e humanos diabéticos (CONSIDINE *et al.*, 1995). Sabidamente, a ativação de PKC- θ aumenta a fosforilação de IRS1 no resíduo Ser³⁰⁷ (YU *et al.*, 2002) ou Ser¹¹⁰¹ (LI, Y. *et al.*, 2004), o que diminui ou mesmo bloqueia a fosforilação de resíduos de tirosina, diminuindo a atividade da PI3K e a transmissão do sinal insulínico. Portanto, as respostas diferenciais encontradas entre EDL e soleus em resposta à suplementação com Ca⁺² podem estar associadas à ativação seletiva das PKCs em EDL, o que pode ter levado à inativação da PI3K/Akt nesse músculo.

Verificou-se nesse estudo que a suplementação materna com Ca⁺² também contribuiu para a atrofia muscular observada na prole, o que sugere um papel regulatório negativo desse íon na plasticidade muscular. É sabido que o aumento sustentado de Ca⁺² intracelular leva à degradação de proteínas ao ativar as calpaínas 1 e 2 (GOLL *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, ambos os grupos de machos e fêmeas VDD apresentaram aumento no conteúdo de calpaína-2, em especial no músculo EDL. Sabe-se também que a insulina participa da regulação das calpaínas. Brooks *et al.* (1983) descobriram que a inibição da secreção de insulina em ratos leva à ativação das proteases dependentes de Ca²⁺ (BROOKS *et al.*, 1983). O mesmo foi demonstrado por Pepato *et al.* (1996) que verificaram aumento desta atividade proteolítica em EDL e soleus de ratos, 1 a 3 dias após a indução do diabetes por estreptozotocina (PEPATO *et al.*, 1996). De forma coerente com esses estudos, observou-se que a incubação de CSs de porcos com insulina regulou negativamente a transcrição da calpaína-2 (THEIL *et al.*, 2006). Esses resultados corroboram com os nossos dados, uma vez que ambos os grupos de machos VDD apresentaram hipoinsulinemia. O aumento do conteúdo de p25, a forma clivada de p35, substrato bem conhecido das calpaínas, é um forte indicador de que essas proteases estejam ativas. O fato desse achado ser observado apenas em EDL de M-VDD-Ca e não em soleus

poderia ser explicado pelo fato dos músculos oxidativos apresentarem quantidades maiores de calpastatina, um conhecido inibidor de calpaínas (BHAT, Z. F. *et al.*, 2018; KOOHMARAIE, 1996). Portanto, esses dados mostram que apesar do Ca^{+2} melhorar a sinalização da Insulina-IGF-1/Akt e a síntese proteica, ele deve participar, juntamente com a hipoinsulinemia, do aumento da degradação proteica no grupo M-VDD-Ca, o que explica a atrofia mais severa nesses animais.

Com o objetivo de investigar se a atrofia muscular observada em animais VDD tinha relação com a produção local de Vit. D pelo músculo, foi analisada a quantidade muscular de calcitriol e CYP27B1, a enzima conversora de calcidiol em calcitriol. Embora não se tenha observado alterações na produção de calcitriol no músculo, a concentração da enzima CYP27B1 estava aumentada em EDL de M-VDD e M-VDD-Ca, assim como em soleus de M-VDD e F-VDD-Ca. Esse resultado sugere a existência de um possível mecanismo adaptativo muscular no sentido de compensar as baixas concentrações circulantes de calcidiol. Um achado interessante é que o músculo soleus apresenta quantidades maiores de CYP27B1 quando comparado a EDL. O fato desta enzima ser localizada na mitocôndria poderia explicar a diferença encontrada entre os músculos.

5.2 Efeitos da VDD materna na prole adulta

Os nossos dados mostram que a VDD materna, durante a gravidez e lactação, induz alterações morfológicas e funcionais no músculo esquelético da prole adulta que variam de acordo com o tipo de fibra muscular e o sexo do animal.

Ao contrário da atrofia observada na fase infantil, verificou-se que a VDD, em animais com 180 dias, aumentou seletivamente a área das fibras do tipo II nos músculos EDL e soleus, sendo esta resposta mais evidente no EDL, que é um músculo tipicamente glicolítico. Esse fenótipo não foi acompanhado por qualquer tipo de anormalidade nas concentrações séricas de Ca^{+2} e PTH assim como da glicemia, mas sim da insulinemia e do calcitriol muscular (apenas

em EDL) que se mostraram mais elevados em animais machos deficientes quando comparados aos seus respectivos controles. Como esperado e já relatado em outros estudos (WEN, Juan *et al.*, 2018), a massa do tecido adiposo branco foi também aumentada nesses animais, um efeito associado a modificações epigenéticas dos genes reguladores da lipogênese. A hipertrofia das fibras do tipo II observada em EDL de animais VDD foi provavelmente uma consequência direta do aumento do calcitriol muscular e não da diminuição do calcidiol sérico induzida pela VDD materna. O fato do calcitriol não aumentar nos músculos atroficos de ratos de 21 dias, sugere que mecanismos compensatórios levaram à ativação da CYP27B1, que por sua vez converteu calcidiol em calcitriol em EDL, muito provavelmente para restabelecer a massa muscular na idade adulta. Embora o sinal primário que medeia a indução da síntese de calcitriol no músculo seja desconhecido, estudos prévios sugerem que o IGF-1 pode regular a produção renal de calcitriol via ativação de CYP27B1 (GÓMEZ, 2006; NESBITT; DREZNER, 1993). Se o mesmo efeito ocorreu na fibra muscular esquelética do tipo II, pode-se supor que o aumento da expressão gênica de IGF-1 em EDL de M-VDD aqui descrito possa ser, pelo menos em parte, o responsável pelo aumento da atividade de CYP27B1 nesse músculo.

Apesar da hipertrofia das fibras musculares do tipo II, a massa de EDL do grupo VDD não aumentou, o que pode ser causado pela hipoplasia observada seletivamente neste músculo desde o final do desmame. Isso mostra que a VDD materna resulta em uma diminuição permanente no número de fibras do tipo II em músculo esquelético de contração rápida (EDL) e apoia o paradigma de que o número de fibras musculares é definido ao nascimento (BROWN, 2014).

Considerando que o aumento na área das fibras do tipo II foi associado à hipernuclearidade e aumento do número de CSs no músculo EDL dos machos VDD, aventou-se a possibilidade do envolvimento da síntese proteica neste efeito anabólico. Mecanismos semelhantes já haviam sido descritos em outro modelo hipertrófico como o da sobrecarga de

EDL em camundongos, após a excisão de 2/3 do músculo tibial anterior (BRUUSGAARD *et al.*, 2010). Entretanto, os presentes achados mostram que a hipertrofia ocorre sem qualquer alteração na síntese proteica, assim como também na atividade do proteassoma e expressão de genes e proteínas relacionados à atrofia muscular. Uma vez que todas essas análises foram realizadas em homogenatos de fragmentos de músculos ou de músculos inteiros, como é o caso do SUnSET, é possível que esses métodos não tenham sensibilidade suficiente para detectar as alterações intracelulares responsáveis pela hipertrofia seletiva de fibras musculares do tipo II. Também não se pode descartar o envolvimento desses diferentes mecanismos em um momento da vida do animal anterior ao tempo de eutanásia escolhido, ou seja, antes de 180 dias.

Durante o processo de ativação das CSs, a expressão dos MRFs aumenta e, conseqüentemente, as CSs passam a formar novos miotubos (SABOURIN; RUDNICKI, 2000). De fato, verificou-se um maior conteúdo de MyoD e miogenina principalmente no EDL de ratos machos VDD, o que indica a ativação da miogênese nesses animais. Embora efeitos semelhantes no programa miogênico tenham sido relatados em músculos de animais adultos VDR-KO (ENDO *et al.*, 2003; GIRGIS *et al.*, 2015), esses estudos não associaram as alterações da miogênese com o *status* local de Vit. D. Assim, é possível que o aumento do calcitriol aqui observado exclusivamente nos músculos EDL tenha levado à ativação da miogênese. Essa hipótese é corroborada pelos achados de que o calcitriol altera a expressão de genes reguladores-chaves da progressão do ciclo celular e diferenciação miogênica (OLSSON *et al.*, 2016) e de que os componentes do sistema endócrino de Vit. D (VDR e CYP27B1) no músculo esquelético humano são expressos predominantemente em CSs, sugerindo um papel preferencial da Vit. D nestas células-tronco (OLSSON *et al.*, 2016). Em CSs isoladas de camundongos que expressam VDR, o tratamento com calcitriol aumentou os marcadores miogênicos MyoD e miogenina e melhorou a formação de miotubos (BRAGA *et al.*, 2017). Portanto, mecanismos semelhantes podem ter acontecido em CSs ativadas do EDL de animais

VDD, o que ajudaria a explicar a hipernuclearidade e o aumento da área observadas em fibras do tipo II nesse músculo.

É sabido que a via de sinalização de Insulina-IGF-1/Akt está envolvida na estimulação da hiperplasia/hipertrofia muscular (LI, D. *et al.*, 2014; SCHIAFFINO *et al.*, 2013) e na regulação da miogênese (BRIATA *et al.*, 2012). Demonstrou-se nesse estudo que animais M-VDD melhoraram a sinalização da Insulina/IGF-1 seletivamente no músculo EDL, conforme indicado pelo aumento na fosforilação do receptor de Insulina/IGF-1, IRS-1, Akt e GSK-3 β . Salles *et al.* (2013) demonstraram que o calcitriol pode ativar diretamente a Akt e melhorar a sensibilidade à insulina nas células musculares C2C12 (SALLES *et al.*, 2013). Ademais, a inibição da atividade de GSK-3 β por meio de Akt é suficiente para estimular a diferenciação miogênica. Foi demonstrado que animais GSK-3 β -KO desenvolveram uma expressão precoce de MyoD e miogenina e grande acúmulo mionuclear no músculo esquelético atrofiado por desuso em comparação com animais selvagens (PANSTERS *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* demonstraram que a inibição de GSK-3 β restaurou a diferenciação dependente de insulina e favoreceu os efeitos estimulatórios deste hormônio na expressão de MyoD e miogenina em células C2 quiescentes, mioblastos C2 e células mioblásticas humanas (ROCHAT *et al.*, 2004). Em conjunto, esses dados sugerem que o efeito hipertrófico e promiogênico do VDD nas fibras musculares do tipo II de ratos machos adultos, requer a sinalização de Insulina-IGF-1/Akt e a inativação de GSK-3 β . Estudos futuros deverão esclarecer se o recrutamento dessa via nesse modelo experimental foi resultante do aumento do calcitriol muscular.

Tendo em vista que a prole adulta de animais VDD também apresentou hiperinsulinemia, não se pode descartar que a ativação da via da Akt observada no EDL desses animais tenha sido resultante do próprio efeito da insulina. Os mecanismos relacionados a estes efeitos da VDD materna no pâncreas ainda não são conhecidos. Maia-Ceciliano *et al.* (2016) demonstraram que a prole de camundongos machos de mães VDD, aos 90 dias, apresentou falhas no

desenvolvimento pancreático associadas à hipoinsulinemia (MAIA-CECILIANO *et al.*, 2016). Em outro estudo com protocolo semelhante, analisando a prole masculina aos 180 dias, foi observado aumento em 20 % do diâmetro das ilhotas, assim como da massa das ilhotas e das células β -pancreáticas acompanhada de hiperinsulinemia (NASCIMENTO *et al.*, 2013). No presente estudo, resultados semelhantes foram encontrados, uma vez que a hiperinsulinemia observada aos 180 dias nos machos VDD foi precedida de hipoinsulinemia aos 21 dias de idade e pode ser em parte explicada por uma adaptação das células β -pancreáticas adultas aos efeitos deletérios induzidos pela deficiência intrauterina de Vit. D na vida infantil.

Nossos ensaios funcionais mostram que os músculos EDL do grupo M-VDD desenvolveram maior resistência à fadiga e recuperaram a força específica máxima, após o protocolo de fadiga. Em contraste, os músculos soleus apresentaram uma diminuição acentuada na força específica máxima e na resistência à fadiga. Embora o motivo das diferenças funcionais entre os músculos esqueléticos glicolítico e oxidativo do grupo VDD não possa ser explicado com base nos presentes dados, é interessante notar que o EDL, mas não o soleus, respondeu ao VDD materno com um aumento no metabolismo local de Vit. D. A descoberta de que a atividade da citrato sintase, um indicador da capacidade oxidativa, estava maior nos músculos EDL de VDD do que no grupo controle, oferece uma explicação possível para o aumento da resistência à fadiga observada nesses músculos. O trabalho de Girgis *et al.* (2015) evidenciou que camundongos com VDD e os VDR-KO apresentaram menor expressão de genes relacionados à dinâmica intracelular do Ca^{+2} , como por exemplo aqueles que codificam para calbindina e canais de ATPase (Serca) de transporte de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (GIRGIS *et al.*, 2015). Isso sugere um papel crítico da Vit. D no controle do Ca^{+2} intramuscular por meio de mecanismos genômicos no músculo esquelético e é possível especular que, se uma diminuição semelhante ocorreu no soleus do grupo M-VDD, isso explicaria a fraqueza observada nesses músculos.

Em resumo, foi demonstrado que a VDD materna prejudicou o crescimento da musculatura esquelética na vida pré-natal, o que resultou em atrofia muscular na vida infantil, a um número reduzido de fibras musculares do tipo II e à redução da contração em soleus da prole de machos adultos. No entanto, os músculos esqueléticos de contração rápida (EDL) respondem aumentando sua produção local de Vit. D levando à ativação do programa miogênico, ao aumento do tamanho dessas fibras e maior resistência à fadiga, sendo todos esses efeitos provavelmente mediados pela estimulação da sinalização da Insulina-IGF-1/Akt e consequente inativação da GSK-3 β .

5.3 O dimorfismo sexual nas respostas à VDD materna

Um dos achados mais interessantes deste trabalho é o dimorfismo sexual encontrado no modelo materno de VDD desde o nascimento até à vida adulta da prole. Ao contrário dos machos, a VDD não afetou ou alterou discretamente a morfologia dos tecidos, a concentração sérica de insulina e o metabolismo muscular nas fêmeas.

Entre as poucas alterações observadas, destaca-se que as fêmeas, aos 21 dias, de ambos os grupos VDD, apresentaram redução do conteúdo proteico de atrogina-1 em soleus e EDL e do RNAm de miotastina em soleus. Apesar dos animais deficientes apresentarem aumento no conteúdo de calpaína-2 em EDL, não houve mudanças no conteúdo do substrato p35 e sua forma clivada p25, um indicador indireto da atividade das calpaínas e, em soleus, as fêmeas responderam com aumento de calpastatina e redução da *calpaína-2*. Embora não se possa esclarecer como as fêmeas respondem tão diferentemente dos machos, um possível mecanismo que explica o dimorfismo sexual na programação fetal é o efeito protetor do estrógeno circulante (BALTGALVIS *et al.*, 2010) ou de seus receptores musculares do tipo alfa (RIBAS *et al.*, 2016).

Sabe-se que a produção e a secreção de estrogênios na gravidez aumentam continuamente e estes alcançam a circulação fetal por diferentes vias (TULCHINSKY, 1973;

WARNE *et al.*, 1978). Um trabalho recente demonstrou que, no decorrer da embriogênese, a atividade transcricional do receptor de estrógeno (ER) não se restringe aos órgãos reprodutivos. Os mesmos são particularmente ativos em tecidos originados do ectoderma e mesoderma, como é o caso do sistema musculoesquelético (DELLA TORRE *et al.*, 2018). Se o estrógeno, já em útero, protege as fêmeas de estresses maternos não se sabe. Entretanto, é possível que as respostas diferenciais entre machos e fêmeas observada na prevalência, curso e gravidade de muitas doenças, possam se originar de uma arquitetura genética específica do sexo, que é criada ao longo do período crítico do desenvolvimento e que regula, principalmente, genes responsivos a esteroides sexuais (DELLA TORRE *et al.*, 2018).

A importância dos receptores de E2 do tipo alfa (ER α) no músculo esquelético das fêmeas já foi documentado. Em camundongos fêmeas ER α -KO no músculo esquelético, o *turnover* de mitocôndrias disfuncionais que abrigam DNA mutante contribuem para o estresse oxidativo muscular e inflamação, o que leva à resistência à insulina desse tecido (RIBAS *et al.*, 2016). Há evidências que a adiposidade e a insulina em jejum estão inversamente associadas com a expressão de ER α muscular, o que indica o papel do estrógeno, via ER α , na manutenção da saúde mitocondrial e na homeostase metabólica da musculatura esquelética (RIBAS *et al.*, 2016).

Nesse contexto, foi descrito que o 17 β -estradiol (E2) aumentou o conteúdo de VDR e a capacidade de resposta ao calcitriol em linhagem celular semelhante a osteoblastos (LIEL *et al.*, 1992). A expressão aumentada de VDR, após o tratamento com E2, também foi observada em outros tecidos e tipos de células, como o útero (WALTERS, 1981), fígado (DUNCAN; GLASS; WRAY, 1991) e células de câncer de mama humano (ESCALEIRA; SONOHARA; BRENTANI, 1993). O tratamento com E2 mostrou-se eficaz na recuperação da massa muscular após atrofia ou lesão em roedores e na manutenção da massa muscular em mulheres na pós-menopausa (TIIDUS; LOWE; BROWN, 2013). Dieli-Conwright *et al.* (2009 e 2012) relataram

maior expressão de miostatina, atrogina-1 e MuRF-1 em mulheres pós-menopáusicas em relação a mulheres pós-menopáusicas em reposição hormonal (DIELI-CONWRIGHT *et al.*, 2009, 2012). Curiosamente, a Vit. D e o E2 exercem funções muito semelhantes no músculo esquelético como a regulação da proliferação e diferenciação celular, apoptose e contratilidade e, por vezes, complementares, como na ativação de MAPK na célula muscular (BUIRAGO *et al.*, 2009). Portanto, é possível que a proteção observada nas fêmeas em nosso modelo experimental possa, pelo menos em parte, ser resultante da ação de estrógenos, ainda em útero, em genes reguladores da massa e responsivos a esteroides, incluindo o VDR, atrogina-1 e miostatina.

Uma outra possibilidade para explicar o efeito dimórfico observado nesse estudo foi aventada por Ali *et al.* (2020) ao demonstrarem que a VDD, durante a gravidez, aumenta as concentrações de testosterona no sangue materno. Além disso, foi observada maior concentração de testosterona e androstenediona no fluido amniótico de fetos femininos, mas não dos masculinos (ALI *et al.*, 2020). Isso sugere que a VDD materna pode ter um efeito positivo na produção de andrógenos, em gônadas ou suprarrenais na prole das fêmeas, mas não em machos. Considerando que a testosterona é um importante hormônio anabólico que estimula a síntese proteica (LIU; WU, 2019) e inibe a atrogina-1 (PIRES-OLIVEIRA *et al.*, 2010) e a miostatina (MENDLER *et al.*, 2007), é razoável propor que a sua presença, em maior quantidade, no líquido amniótico da prole feminina, possa manter a massa muscular nesses animais, em nosso modelo de VDD materna.

Outros possíveis mecanismos poderiam incluir estratégias de crescimento mais adaptativas em condições de estresse (ERIKSSON *et al.*, 2000) e uma melhor adaptação da placenta feminina a condições subótimas (ROSENFELD, 2015). Estudos com animais e humanos mostram que os fetos femininos podem tolerar o excesso de glicocorticoides (GCs) melhor do que os fetos masculinos (MAYHEW *et al.*, 2008; O'CONNELL *et al.*, 2011; STARK

et al., 2011). Sabe-se também que a VDD materna aumenta as concentrações plasmáticas de glicocorticoides na mãe e reduz a expressão de 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo II (11 β -HSD2), a enzima que converte os glicocorticoides de sua forma ativa em inativa, na placenta da prole masculina. O trabalho de Tesic *et al.* (2015) descreve redução de 11 β -HSD2 na placenta de camundongos machos VDD, mas não em fêmeas VDD (TESIC *et al.*, 2015), o que demonstra um claro efeito sexualmente dimórfico no modelo de VDD materno.

Conclusão



6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a VDD afeta desde a fertilidade das ratas até o crescimento pós-natal da prole:

1. A VDD diminui o sucesso reprodutivo das ratas e aumenta o risco de mortalidade materna, enquanto que a suplementação com Ca^{+2} não tem efeito na melhora da fertilidade, mas protege totalmente a morte da mãe.
2. A VDD materna diminui o número de filhotes da ninhada e atrasa o crescimento da prole de machos e fêmeas, mas a normalização da calcemia e do PTH não melhora esses parâmetros.

Além disso, a VDD materna afeta o crescimento do músculo esquelético de ratos jovens:

1. A VDD materna induz deficiência extrema de Vit. D, hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário nos filhotes machos e fêmeas aos 21 dias de idade. A prole de machos VDD apresenta ainda atraso no crescimento associado com redução da adiposidade e hipoinsulinemia, efeitos que não são revertidos com a suplementação de Ca^{+2} pelas mães.
2. A VDD materna leva à hipoplasia em EDL de filhotes machos e induz atrofia em diferentes músculos esqueléticos.
3. Os mecanismos intracelulares que levam à atrofia muscular envolvem a ativação do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} (em EDL e soleus) e, provavelmente, do processo de ubiquitinação de proteínas (em EDL). Considerando que a atrofia das fibras musculares de EDL, onde as calpaínas estavam mais ativas, foi mais severa que a de soleus e se agrava em filhos de mães suplementadas com Ca^{+2} , sugere-se que a hipocalcemia e/ou o hiperparatireoidismo, não foram a causa da perda de massa muscular no grupo M-VDD.
4. A deficiência de Vit. D circulante associada à hipoinsulinemia em animais M-VDD e M-VDD-Ca devem estar envolvidos no aumento da atividade proteolítica dependente de Ca^{+2}

e da maior expressão de atrogina-1 no modelo de programação fetal induzido pelo VDD materno.

5. A redução da síntese em soleus, foi provavelmente causada pela hipocalcemia e/ou hiperparatireoidismo, já que a suplementação de Ca^{+2} reverteu completamente este efeito catabólico para valores acima dos controles e estimulou a sinalização de Insulina-IGF-1/Akt nesse músculo na prole de machos e fêmeas. Entretanto, em EDL, a suplementação também estimula a síntese e em paralelo, ativa a PKC e prejudica a sinalização da insulina nos machos. Portanto, esses dados sugerem que a síntese proteica não participou da atrofia induzida pela VDD em ambos os músculos.
6. A VDD materna não leva a mudanças na produção local de Vit. D pelos músculos. Mas, os músculos dos machos e fêmeas VDD aumentam o conteúdo de CYP27B1, o que sugere um mecanismo adaptativo muscular.
7. Todas as alterações musculares decorrentes da VDD materna observada nos filhotes machos, não foram encontradas nas fêmeas, o que sugere que esse modelo experimental é sexo-específico. É possível que os músculos das fêmeas tenham melhor se adaptado em útero à VDD materna e inativado, aos 21 dias, mecanismos regulatórios negativos da massa muscular, como aumento da calpastatina, redução da atrogina-1, miostatina e da atividade do proteassoma.

Na vida adulta, machos VDD se adaptam à programação fetal induzida pela VDD materna:

1. A prole de mães VDD melhora as concentrações circulantes de calcidiol aos 180 dias, embora esses valores continuem significativamente menores que os de animais controles.
2. A VDD materna induz atraso no crescimento da prole de machos e fêmeas que só é recuperada aos dois meses de idade. Associado a isso, os machos apresentam aumento da adiposidade e hiperinsulinemia.

3. A hipoplasia observada em EDL na fase infantil é mantida na vida adulta e, provavelmente, gerou uma resposta adaptativa muscular que levou a ativação da miogênese.
4. Os músculos EDL de M-VDD desenvolvem hipertrofia de fibras musculares do tipo II, efeito que deve ser mediado pelo aumento compensatório na produção local de Vit. D que levou ao estímulo da via de sinalização de Insulina-IGF-1/Akt e inativação de GSK-3 β .
5. A prole M-VDD adulta adquire maior resistência à fadiga em EDL e perda da função contrátil em soleus. É possível que essa diferença funcional seja explicada pela hipertrofia de fibras glicolíticas e pela maior quantidade de calcitriol e citrato sintase em EDL.
6. Assim como na fase infantil, as fêmeas VDD adultas praticamente não apresentam alterações hormonais, morfológicas e metabólicas musculares, mostrando que, pelo menos até essa idade, as fêmeas são totalmente protegidas do insulto de depleção de Vit. D em útero.

Nossos resultados contribuem para o melhor entendimento do papel fisiológico da Vit. D no crescimento e desenvolvimento da musculatura esquelética na infância e idade adulta da prole de ratos e mostra um claro dimorfismo sexual nessas respostas. Foi demonstrada, pela primeira vez na literatura, a participação das calpaínas na atrofia muscular induzida pela VDD materna, sendo os músculos glicolíticos (EDL) da prole masculina muito mais sensíveis à falta deste hormônio quando comparados aos oxidativos (soleus). O fato de a atrofia ter sido totalmente revertida, ao longo do tempo, e a musculatura glicolítica desenvolver fibras hipertróficas e resistência à fadiga evidenciam a enorme capacidade plástica da musculatura esquelética frente a um desafio catabólico. A demonstração da existência de um sistema de produção de Vit. D intramuscular, muito mais ativo em EDL do que em soleus, e que é ativado em resposta à baixa concentração de calcidiol circulante é intrigante e sugere um novo papel regulatório da Vit. D na proteção local da massa muscular (**Figura 32**).

Estudos futuros deverão esclarecer os mecanismos envolvidos: 1) na maior responsividade das fibras glicolíticas aos efeitos de curto e longo prazo da VDD materna na prole de ratos machos; 2) nas respostas contráteis diferenciais verificadas em EDL e soleus da prole masculina deficiente, na vida adulta; 3) os mecanismos envolvidos na ativação da CYP27B1 no músculo e a função do calcitriol produzido localmente; 4) na resposta dimórfica sexual induzida pela VDD materna no músculo esquelético da prole.

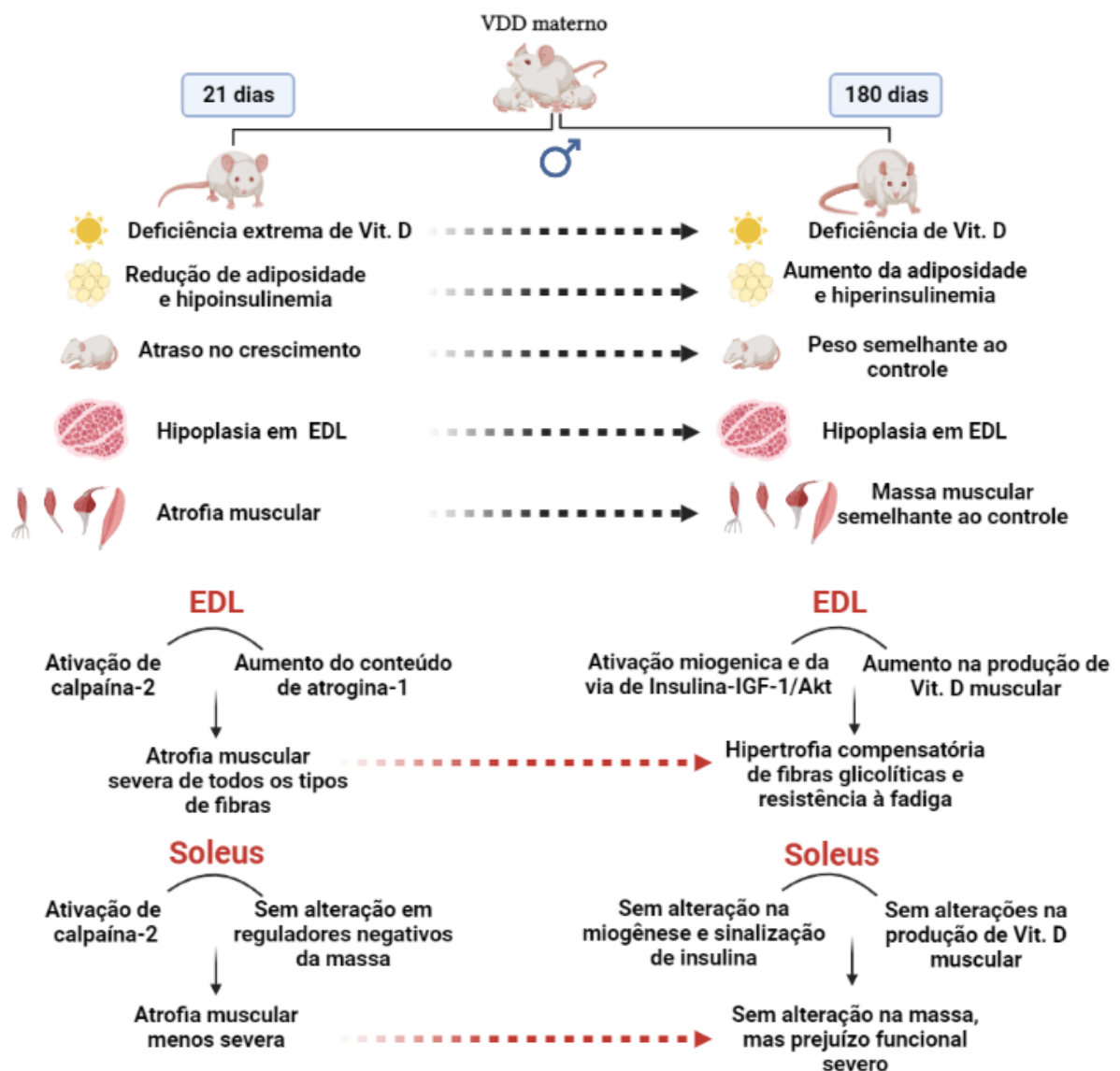


Figura 32: Resumo dos principais achados encontrados na prole de machos de mães deficientes em Vit. D (VDD), aos 21 e 180 dias de vida. Desenho criado pela autora no site BioRender.com.

Referências



REFERÊNCIAS

- ABADIA, L. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and treatment outcomes of women undergoing assisted reproduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 729–735, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.126359>
- ABBOUD, M. *et al.* Evidence for a Specific Uptake and Retention Mechanism for 25-Hydroxyvitamin D (25OHD) in Skeletal Muscle Cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 154, n. 9, p. 3022–3030, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2012-2245>
- AGROGIANNIS, G. D. *et al.* Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 579–584, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2258>
- AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 4.eded. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- ALI, A. A. *et al.* Developmental vitamin D deficiency increases foetal exposure to testosterone. **Molecular autism**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 96, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00399-2>
- ALMEIDA, L. F. *et al.* Renal developmental disturbances and their long-term consequences in female pups from vitamin D-deficient mothers: involved mechanisms. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 497–501, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1017/S2040174418000909>
- ALUR, P. Sex Differences in Nutrition, Growth, and Metabolism in Preterm Infants. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00022>
- AMERI, P. *et al.* Vitamin D increases circulating IGF1 in adults: potential implication for the treatment of GH deficiency. **European Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 169, n. 6, p. 767–772, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0510>
- ARNOLD, D. L. *et al.* Early Pregnancy Maternal Vitamin D Concentrations and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 200–210, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/ppe.12182>
- ASADI, M. *et al.* Vitamin D improves endometrial thickness in PCOS women who need intrauterine insemination: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 289, n. 4, p. 865–870, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3055-x>
- AUFDENBLATTEN, M. *et al.* Prematurity Is Related to High Placental Cortisol in Preeclampsia. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 198–202, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31818d6c24>
- BACZYNSKI, R. *et al.* Effect of parathyroid hormone on energy metabolism of skeletal muscle. **Kidney International**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 722–727, 1985. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.1985.190>
- BALTGALVIS, K. A. *et al.* Estrogen Regulates Estrogen Receptors and Antioxidant Gene Expression in Mouse Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10164, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010164>
- BERNAL, A. B. *et al.* Maternal Undernutrition Significantly Impacts Ovarian Follicle Number and Increases Ovarian Oxidative Stress in Adult Rat Offspring. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e15558, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015558>
- BERNE, ROBERT M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. eded. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- BHAT, M. *et al.* Vitamin D deficiency-induced muscle wasting occurs through the ubiquitin proteasome pathway and is partially corrected by calcium in male rats. **Endocrinology**, [s. l.], v. 154, n. 11, p. 4018–4029, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1369>
- BHAT, Z. F. *et al.* Role of calpain system in meat tenderness: A review. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 196–204, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.08.002>

- BHAUMICK, B.; BALA, R. M. Differential effects of insulin-like growth factors I and II on growth, differentiation and glucoregulation in differentiating chondrocyte cells in culture. **Acta Endocrinologica**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 201–211, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1530/acta.0.1250201>
- BIANCO, M. E.; JOSEFSON, J. L. Hyperglycemia During Pregnancy and Long-Term Offspring Outcomes. **Current Diabetes Reports**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 143, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1267-6>
- BIKLE, D. D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. **Chemistry & Biology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 319–329, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- BLAND, R. *et al.* Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 89–90, n. 1–5, p. 121–125, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.115>
- BODINE, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- BODNAR, L. M. *et al.* Maternal Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Associated with Small-for-Gestational Age Births in White Women. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 999–1006, 2010. Available at: <https://doi.org/10.3945/jn.109.119636>
- BODNAR, L. M. *et al.* Maternal Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Preeclampsia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 92, n. 9, p. 3517–3522, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0718>
- BOGAZZI, F. *et al.* Vitamin D status may contribute to serum insulin-like growth factor I concentrations in healthy subjects. **Journal of endocrinological investigation**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. e200-3, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3275/7228>
- BOLAND, R. Role of Vitamin D in Skeletal Muscle Function*. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 434–448, 1986. Available at: <https://doi.org/10.1210/edrv-7-4-434>
- BORNSTEDT, M. E. *et al.* Vitamin D Increases Glucose Stimulated Insulin Secretion from Insulin Producing Beta Cells (INS1E). **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. In Press, n. In Press, 2019. Available at: <https://doi.org/10.5812/ijem.74255>
- BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 726–776, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>
- BOWYER, L. *et al.* Vitamin D, PTH and calcium levels in pregnant women and their neonates. **Clinical endocrinology**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 372–377, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03316.x>
- BRAGA, M. *et al.* Vitamin D induces myogenic differentiation in skeletal muscle derived stem cells. **Endocrine connections**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 139–150, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1530/EC-17-0008>
- BRENNAN-SPERANZA, T. C. *et al.* Skeletal muscle vitamin D in patients with end stage osteoarthritis of the knee. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 173, p. 180–184, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.022>
- BRIATA, P. *et al.* PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 478–487, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.117>
- BRIDGMAN, S. L. *et al.* Impact of maternal pre-pregnancy overweight on infant overweight at 1 year of age: associations and sex-specific differences. **Pediatric obesity**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 579–589, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijpo.12291>
- BROOKS, B. A. *et al.* Effect of alloxan diabetes on a Ca²⁺-activated proteinase in rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 244, n. 3, p. C175-81, 1983. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.244.3.C175>
- BROWN, L. D. Endocrine regulation of fetal skeletal muscle growth: impact on future metabolic health.

The Journal of endocrinology, [s. l.], v. 221, n. 2, p. R13-29, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0567>

BRUUSGAARD, J. C. *et al.* Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 34, p. 15111–15116, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913935107>

BUITRAGO, C. *et al.* 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ and 17β-Estradiol: Two Steroid Partners Acting in Skeletal Muscle. **Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 159–168, 2009. Available at: <https://doi.org/10.2174/187152209789760585>

CAMPERI, A. *et al.* Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 13, p. 21778–21793, 2017. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15583>

CHEN, T. *et al.* Developmental origins of inflammatory and immune diseases. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 858–865, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw036>

CHEN, W.; DATZKIW, D.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells in ageing: use it or lose it. **Open Biology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 200048, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.200048>

CIEPIELA, P. *et al.* Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 1265–1276, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1179-4>

CLEMENTS, M. R.; FRASER, D. R. Vitamin D supply to the rat fetus and neonate. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 1768–1773, 1988. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI113518>

CONSIDINE, R. V. *et al.* Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 2938–2944, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI118001>

COSTELLI, P. *et al.* Ca²⁺-dependent proteolysis in muscle wasting. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 2134–2146, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.03.010>

DELL'ORSO, S. *et al.* Single-cell analysis of adult skeletal muscle stem cells in homeostatic and regenerative conditions. **Development**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.174177>

DELLA TORRE, S. *et al.* Transcriptional activity of oestrogen receptors in the course of embryo development. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 238, n. 3, p. 165–176, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0003>

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 80, n. 6 Suppl, p. 1689S-96S, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1689S>

DESAI, M.; HALES, C. N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 329–348, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1017/s0006323196005026>

DIELI-CONWRIGHT, C. M. *et al.* Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. **Journal of strength and conditioning research**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1374–1382, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318251083f>

DIELI-CONWRIGHT, C. M. *et al.* Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 1381–1388, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00590.2009>

DU, M. *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 88, n. 13 Suppl, p. E51-60, 2010. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2311>

DUNCAN, W. E.; GLASS, A. R.; WRAY, H. L. Estrogen regulation of the nuclear 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat liver and kidney. **Endocrinology**, [s. l.], v. 129, n. 5, p. 2318–2324, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2318>

EDWARDS, P. D.; BOONSTRA, R. Glucocorticoids and CBG during pregnancy in mammals: diversity,

pattern, and function. **General and comparative endocrinology**, [s. l.], v. 259, p. 122–130, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2017.11.012>

ENDO, I. *et al.* Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. **Endocrinology**, [s. l.], v. 144, n. 12, p. 5138–5144, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0502>

ERIKSSON, J. *et al.* Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 790–794, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.5.790>

ESCALEIRA, M. T. F.; SONOHARA, S.; BRENTANI, M. M. Sex steroids induced up-regulation of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ receptors in T 47D breast cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 257–263, 1993. Available at: [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90340-3](https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90340-3)

EVANO, B.; TAJBAKSH, S. Skeletal muscle stem cells in comfort and stress. **npj Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 24, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0062-3>

EYLES, D. *et al.* Vitamin D₃ and brain development. **Neuroscience**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 641–653, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00040-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00040-x)

FANG, K. *et al.* Maternal vitamin D deficiency during pregnancy and low birth weight: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1167–1173, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1623780>

FIOROTTO, M. L.; DAVIS, T. A. Critical Windows for the Programming Effects of Early-Life Nutrition on Skeletal Muscle Mass. **Nestle Nutrition Institute workshop series**, [s. l.], v. 89, p. 25–35, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1159/000486490>

FLEET, J. C. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 134, n. 12, p. 3215–3218, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3215>

GARCIA, L. A. *et al.* 1,25(OH)₂vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 152, n. 8, p. 2976–2986, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2011-0159>

GARLAND, C. F. *et al.* The role of vitamin D in cancer prevention. **American journal of public health**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 252–261, 2006. Available at: <https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.045260>

GAYRAUD-MOREL, B.; CHRÉTIEN, F.; TAJBAKSH, S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. **Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 293–319, 2009. Available at: <https://doi.org/10.2217/17460751.4.2.293>

GEZMISH, O. *et al.* Maternal vitamin D deficiency leads to cardiac hypertrophy in rat offspring. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 168–176, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1177/1933719109349536>

GIRARDI, F.; LE GRAND, F. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *In*: [S. l.: s. n.], 2018. p. 157–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.026>

GIRGIS, C. M. *et al.* The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. **Endocrinology**, [s. l.], v. 155, n. 9, p. 3227–3237, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2014-1016>

GIRGIS, C. M. *et al.* Vitamin D Receptor Ablation and Vitamin D Deficiency Result in Reduced Grip Strength, Altered Muscle Fibers, and Increased Myostatin in Mice. **Calcified tissue international**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 602–610, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0054-x>

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 373–428, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>

GOLL, D. E. *et al.* The calpain system. **Physiological reviews**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 731–801, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>

- GOMES, M. D. *et al.* Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- GÓMEZ, J. M. The role of insulin-like growth factor I components in the regulation of vitamin D. **Current pharmaceutical biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 125–132, 2006. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920106776597621>
- GOODMAN, C. A.; HORNBERGER, T. A. Measuring Protein Synthesis With SUnSET. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 107–115, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182798a95>
- GOPINATH, S. D. Inhibition of Stat3 signaling ameliorates atrophy of the soleus muscles in mice lacking the vitamin D receptor. **Skeletal muscle**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0121-2>
- HADDAD, J. G. Human serum binding protein for vitamin D and its metabolites (DBP): Evidence that actin is the DBP binding component in human skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 213, n. 2, p. 538–544, 1982. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90581-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90581-1)
- HALLORAN, B. P.; DELUCA, H. F. Effect of Vitamin D Deficiency on Fertility and Reproductive Capacity in the Female Rat. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 110, n. 8, p. 1573–1580, 1980. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/110.8.1573>
- HÄRING, H. *et al.* Tumor-promoting phorbol esters increase the Km of the ATP-binding site of the insulin receptor kinase from rat adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 261, n. 8, p. 3869–3875, 1986. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005303>
- HARVEY, M. B.; KAYE, P. L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 195–199, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310306>
- HAUSSLER, M. R.; NORMAN, A. W. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 155–162, 1969. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.62.1.155>
- HEMBERGER, M.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 526–537, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2727>
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M. *et al.* The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. **Seminars in cell & developmental biology**, [s. l.], v. 72, p. 10–18, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010>
- HINES, E. A. *et al.* Improvement of maternal vitamin D status with 25-hydroxycholecalciferol positively impacts porcine fetal skeletal muscle development and myoblast activity. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 91, n. 9, p. 4116–4122, 2013. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6565>
- HOENDEROP, J. G. J.; NILIUS, B.; BINDELS, R. J. M. Calcium absorption across epithelia. **Physiological reviews**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 373–422, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2004>
- HSU, C.-N.; TAIN, Y.-L. The Good, the Bad, and the Ugly of Pregnancy Nutrients and Developmental Programming of Adult Disease. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11040894>
- HUANG, J. Y. *et al.* Maternal birthweight is associated with subsequent risk of vitamin D deficiency in early pregnancy. **Paediatric and perinatal epidemiology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 472–480, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/ppe.12069>
- HUDSON, M. B.; PRICE, S. R. Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 2173–2178, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.029>
- IDERAABDULLAH, F. Y. *et al.* Maternal vitamin D deficiency and developmental origins of health and disease (DOHaD). **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 241, n. 2, p. R65–R80, 2019. Available at:

<https://doi.org/10.1530/JOE-18-0541>

INOMATA, M. *et al.* Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of microM order concentration. **Journal of biochemistry**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 291–294, 1983. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134166>

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 33, n. S3, p. 245–254, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1089>

JANI, S. *et al.* Distinct mechanisms involving diacylglycerol, ceramides, and inflammation underlie insulin resistance in oxidative and glycolytic muscles from high fat-fed rats. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 19160, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98819-7>

JOHNSON, J. A. *et al.* Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 267, n. 3 Pt 1, p. E356–60, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.3.E356>

JOHNSON, L. E.; DELUCA, H. F. Vitamin D Receptor Null Mutant Mice Fed High Levels of Calcium Are Fertile. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 1787–1791, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/131.6.1787>

KARASIK, A. *et al.* Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosphorylation in liver of starved rats. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 265, n. 18, p. 10226–10231, 1990. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2354998>

KHALESSI, N. *et al.* The Relationship between Maternal Vitamin D Deficiency and Low Birth Weight Neonates. **Journal of family & reproductive health**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 113–117, 2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622309>

KHAN, F. R. *et al.* Relationship among Hypovitaminosis D, Maternal Periodontal Disease, and Low Birth Weight. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 36–39, 2018. Available at: <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2018.01.36>

KINUTA, K. *et al.* Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads*. **Endocrinology**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 1317–1324, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7403>

KLAUDE, M. *et al.* Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. **Clinical Science**, [s. l.], v. 112, n. 9, p. 499–506, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1042/CS20060265>

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, [s. l.], v. 43, p. 193–201, 1996. Available at: [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)00065-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)00065-4)

KUNADIAN, V. *et al.* Vitamin D deficiency and coronary artery disease: a review of the evidence. **American heart journal**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 283–291, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2013.11.012>

LASCO, A. Improvement of Primary Dysmenorrhea Caused by a Single Oral Dose of Vitamin D: Results of a Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Study. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 172, n. 4, p. 366, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.715>

LE MOULLEC, N. *et al.* Sexual dimorphism in the association between gestational diabetes mellitus and overweight in offspring at 5-7 years: The OBEGEST cohort study. **PloS one**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. e0195531, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195531>

LI, D. *et al.* Hyperplasia and Cellularity Changes in IGF-1-Overexpressing Skeletal Muscle of Crucian Carp. **Endocrinology**, [s. l.], v. 155, n. 6, p. 2199–2212, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1938>

LI, J. *et al.* Vitamin D prevents lipid accumulation in murine muscle through regulation of PPAR γ and perilipin-2 expression. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 177, p. 116–124, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.010>

LI, Y. *et al.* Protein kinase C Theta inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser(1101). **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 44, p. 45304–45307, 2004. Available at:

<https://doi.org/10.1074/jbc.C400186200>

LIEL, Y. *et al.* Evidence that estrogens modulate activity and increase the number of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8). **Endocrinology**, [s. l.], v. 130, n. 5, p. 2597–2601, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.130.5.1315250>

LITTLEJOHNS, T. J. *et al.* Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. **Neurology**, [s. l.], v. 83, n. 10, p. 920–928, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000755>

LIU, J.-D.; WU, Y.-Q. Anabolic-androgenic steroids and cardiovascular risk. **Chinese medical journal**, [s. l.], v. 132, n. 18, p. 2229–2236, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000407>

LORENZO, M. *et al.* IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 123, n. 6, p. 1567–1575, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1567>

LOWELL, B. B.; RUDERMAN, N. B.; GOODMAN, M. N. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 234, n. 1, p. 237–240, 1986. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2340237>

MAESTRO, B. *et al.* Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D 3. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 227–232, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbf.951>

MAESTRO, Begoña *et al.* Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 84, n. 2–3, p. 223–230, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00032-3)

MAIA-CECILIANO, T. C. *et al.* Maternal vitamin D-restricted diet has consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice. **Endocrine**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 60–69, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0973-y>

MAKANAE, Y. *et al.* Acute bout of resistance exercise increases vitamin D receptor protein expression in rat skeletal muscle. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 100, n. 10, p. 1168–1176, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1113/EP085207>

MARTINEZ, S. R.; GAY, M. S.; ZHANG, L. Epigenetic mechanisms in heart development and disease. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 799–811, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.12.018>

MASON, R. S. *et al.* The Role of Skeletal Muscle in Maintaining Vitamin D Status in Winter. **Current developments in nutrition**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. nzz087, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz087>

MATILAINEN, M. Regulation of multiple insulin-like growth factor binding protein genes by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. 17, p. 5521–5532, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gki872>

MAYHEW, T. M. *et al.* Maternal asthma and placental morphometry: effects of severity, treatment and fetal sex. **Placenta**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 366–373, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.01.011>

MCGILL, A.-T. *et al.* Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. **Nutrition journal**, [s. l.], v. 7, p. 4, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-7-4>

MCMILLEN, I. C. *et al.* Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 82–89, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00188.x>

MENDLER, L. *et al.* Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 361, n. 1, p. 237–242, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.023>

MUSARÒ, A. *et al.* IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. **Nature**, [s. l.], v. 400, n. 6744, p. 581–585, 1999. Available at:

<https://doi.org/10.1038/23060>

NASCIMENTO, F. A. M. *et al.* Transgenerational effects on the liver and pancreas resulting from maternal vitamin D restriction in mice. **Journal of nutritional science and vitaminology**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 367–374, 2013. Available at: <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.367>

NESBITT, T.; DREZNER, M. K. Insulin-like growth factor-I regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity. **Endocrinology**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 133–138, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419119>

NOBRE, J L *et al.* Calcium supplementation reverts central adiposity, leptin, and insulin resistance in adult offspring programmed by neonatal nicotine exposure. **The Journal of endocrinology**, [s. l.], v. 210, n. 3, p. 349–359, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0172>

NOBRE, Jessica Lopes *et al.* Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinaemia and hyperglycaemia in adult rats programmed by early weaning. **The British journal of nutrition**, [s. l.], v. 107, n. 7, p. 979–988, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114511003928>

O'CONNELL, B. A. *et al.* The placental response to excess maternal glucocorticoid exposure differs between the male and female conceptus in spiny mice. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 85, n. 5, p. 1040–1047, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093369>

OJUKA, E. O. *et al.* Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca 2+. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 282, n. 5, p. E1008–E1013, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00512.2001>

OLSSON, K. *et al.* Evidence for Vitamin D Receptor Expression and Direct Effects of 1 α ,25(OH)2D3 in Human Skeletal Muscle Precursor Cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 98–111, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1685>

ONTELL, M.; KOZEKA, K. Organogenesis of the mouse extensor digitorum logus muscle: a quantitative study. **The American journal of anatomy**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 149–161, 1984. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001710203>

OTT, J. *et al.* Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. **European Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 166, n. 5, p. 897–902, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-11-1070>

PANSTERS, N. A. M. *et al.* Muscle-specific GSK-3 β ablation accelerates regeneration of disuse-atrophied skeletal muscle. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1852, n. 3, p. 490–506, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.006>

PEPATO, M. T. *et al.* Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 271, n. 2, p. E340–E347, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.2.E340>

PEREIRA, M. G. *et al.* Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e85283, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085283>

PETTITT, D. J. *et al.* Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. **Diabetes**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 622–628, 1988. Available at: <https://doi.org/10.2337/diab.37.5.622>

PETTITT, D. J. *et al.* Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 308, n. 5, p. 242–245, 1983. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198302033080502>

PIRES-OLIVEIRA, M. *et al.* Testosterone represses ubiquitin ligases atrogin-1 and Murf-1 expression in an androgen-sensitive rat skeletal muscle in vivo. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 266–273, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00490.2009>

PLEASURE, D. *et al.* Skeletal Muscle Calcium Metabolism and Contractile Force in Vitamin D-deficient Chicks. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 1157–1167, 1979. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI109569>

POLYZOS, N. P. *et al.* Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo,

blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 2032–2040, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/deu156>

RACHEZ, C.; FREEDMAN, L. P. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. **Gene**, [s. l.], v. 246, n. 1–2, p. 9–21, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00052-4)

RAJABI-NAEENI, M. *et al.* The effect of omega-3 and vitamin D co-supplementation on glycemic control and lipid profiles in reproductive-aged women with pre-diabetes and hypovitaminosis D: a randomized controlled trial. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 41, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00549-9>

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; 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. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

REICHETZEDER, C. *et al.* Maternal vitamin D deficiency and fetal programming--lessons learned from humans and mice. **Kidney & blood pressure research**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 315–329, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1159/000355809>

RIBAS, V. *et al.* Skeletal muscle action of estrogen receptor α is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 8, n. 334, p. 334ra54, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3815>

ROCHAT, A. *et al.* Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. **Molecular biology of the cell**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 4544–4555, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0816>

RODOSTHENOUS, R. S. *et al.* Second trimester extracellular microRNAs in maternal blood and fetal growth: An exploratory study. **Epigenetics**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 804–810, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1358345>

ROSENFELD, C. S. Sex-Specific Placental Responses in Fetal Development. **Endocrinology**, [s. l.], v. 156, n. 10, p. 3422–3434, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1227>

SABOURIN, L. A.; RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical genetics**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 16–25, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2000.570103.x>

SALLES, J. *et al.* 1,25(OH)₂-vitamin D₃ enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C2C12 skeletal myotubes. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 57, n. 12, p. 2137–2146, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300074>

SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 2121–2129, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>

SATO, Y. *et al.* Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 187–192, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1159/000087203>

SCHARFF, R.; WOOL, I. G. CONCENTRATION OF AMINO ACIDS IN RAT MUSCLE AND PLASMA. **Nature**, [s. l.], v. 202, p. 603–604, 1964. Available at: <https://doi.org/10.1038/202603a0>

SCHIAFFINO, S. *et al.* Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 280, n. 17, p. 4294–4314, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.12253>

SCHMIDT, E. K. *et al.* SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 275–277, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>

SELDEEN, K. L. *et al.* Chronic vitamin D insufficiency impairs physical performance in C57BL/6J mice. **Ageing**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1338–1355, 2018. Available at: <https://doi.org/10.18632/aging.101471>

SEMSARIAN, C. *et al.* Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. **Nature**, [s. l.], v. 400, n. 6744, p. 576–581, 1999. Available at:

<https://doi.org/10.1038/23054>

SHAHGHEIBI, S.; FARHADIFAR, F.; POUYA, B. The effect of vitamin D supplementation on gestational diabetes in high-risk women: Results from a randomized placebo-controlled trial. **Journal of Research in Medical Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 2, 2016. Available at: <https://doi.org/10.4103/1735-1995.175148>

SHIMADA, T. *et al.* FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 429–435, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>

SHIMIZU, N. *et al.* Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 170–182, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.001>

SIMPSON, R. U.; THOMAS, G. A.; ARNOLD, A. J. Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and activities in muscle. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 15, p. 8882–8891, 1985. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2991224>

SØRENSEN, I. M. *et al.* Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. **Diabetes**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 175–178, 2012. Available at: <https://doi.org/10.2337/db11-0875>

SØRENSEN, O. H. *et al.* Myopathy in Bone Loss of Ageing: Improvement by Treatment with 1 α -hydroxycholecalciferol and Calcium. **Clinical Science**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 157–161, 1979. Available at: <https://doi.org/10.1042/cs0560157>

SRIKUEA, R. *et al.* VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. **American journal of physiology. Cell physiology**, [s. l.], v. 303, n. 4, p. C396-405, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00014.2012>

STARK, M. J. *et al.* Influence of sex and glucocorticoid exposure on preterm placental pro-oxidant-antioxidant balance. **Placenta**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 865–870, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.010>

STAVENUITER, A. W. D. *et al.* A Novel Rat Model of Vitamin D Deficiency: Safe and Rapid Induction of Vitamin D and Calcitriol Deficiency without Hyperparathyroidism. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 1–5, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/604275>

SUZUKI, K. *et al.* Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, [s. l.], v. 376, n. 9, p. 523–529, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1515/bchm3.1995.376.9.523>

SUZUKI, T. *et al.* Low serum 25-hydroxyvitamin D levels associated with falls among Japanese community-dwelling elderly. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1309–1317, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1359/jbmr.080328>

TARE, M. *et al.* Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. **The Journal of physiology**, [s. l.], v. 589, n. Pt 19, p. 4777–4786, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214726>

TESIC, D. *et al.* Vitamin D Deficiency in BALB/c Mouse Pregnancy Increases Placental Transfer of Glucocorticoids. **Endocrinology**, [s. l.], v. 156, n. 10, p. 3673–3679, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1377>

THEIL, P. K. *et al.* Changes in proteolytic enzyme mRNAs relevant for meat quality during myogenesis of primary porcine satellite cells. **Meat Science**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 335–343, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.12.014>

TIDBALL, J. G.; SPENCER, M. J. Calpains and muscular dystrophies. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1–5, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00095-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00095-3)

TIIDUS, P. M.; LOWE, D. A.; BROWN, M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and

population health. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 569–578, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00629.2013>

TORKILDSEN, O. *et al.* Month of birth as a risk factor for multiple sclerosis: an update. **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, [s. l.], n. 195, p. 58–62, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/ane.12040>

TULCHINSKY, D. Placental Secretion of Unconjugated Estrone, Estradiol and Estriol into the Maternal and the Fetal Circulation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1079–1087, 1973. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-36-6-1079>

VAN DER MEIJDEN, K. *et al.* Effects of 1,25(OH)₂D₃ and 25(OH)D₃ on C2C12 Myoblast Proliferation, Differentiation, and Myotube Hypertrophy. **Journal of cellular physiology**, [s. l.], v. 231, n. 11, p. 2517–2528, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.25388>

WALTERS, M. R. An estrogen-stimulated 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat uterus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 721–726, 1981. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)90509-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)90509-X)

WANG, T.-T. *et al.* Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 2685–2695, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2005-0106>

WARNE, G. L. *et al.* Studies on human sexual development. VI. Concentrations of unconjugated dehydroepiandrosterone, estradiol, and estriol in amniotic fluid throughout gestation. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 1363–1367, 1978. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-47-6-1363>

WEHR, E.; PIEBER, T. R.; OBERMAYER-PIETSCH, B. Effect of vitamin D₃ treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. **Journal of endocrinological investigation**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 757–763, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3275/7748>

WEN, J. *et al.* Association of maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in second and third trimester with risk of gestational diabetes and other pregnancy outcomes. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 489–496, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.227>

WEN, Juan *et al.* The effect of maternal vitamin D deficiency during pregnancy on body fat and adipogenesis in rat offspring. **Scientific reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 365, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18770-4>

WILLIAMS, R. S. *et al.* Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 261, n. 1, p. 376–380, 1986. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3941082>

WILSON, S. J.; ROSS, J. J.; HARRIS, A. J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 815–821, 1988. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3168790>

WISE, L. A. *et al.* Polymorphisms in vitamin D–related genes and risk of uterine leiomyomata. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 503-510.e1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.037>

WOJTUSIK, J.; JOHNSON, P. A. Vitamin D Regulates Anti-Mullerian Hormone Expression in Granulosa Cells of the Hen1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 86, n. 3, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094110>

WRIGHT, D. C. *et al.* Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. **Diabetes**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 330–335, 2004. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.330>

XU, J. *et al.* Vitamin D₃ Regulates Follicular Development and Intrafollicular Vitamin D Biosynthesis and Signaling in the Primate Ovary. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01600>

YU, C. *et al.* Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-

1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 52, p. 50230–50236, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M200958200>

ZANOÛ, N. *et al.* Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 18, p. 14524–14534, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341784>

ZEHNDER, D. *et al.* The Ontogeny of 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Expression in Human Placenta and Decidua. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 105–114, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64162-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64162-4)

ZHANG, C. *et al.* Maternal Plasma 25-Hydroxyvitamin D Concentrations and the Risk for Gestational Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. e3753, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003753>

ZHOU, H. *et al.* Improving maternal vitamin D status promotes prenatal and postnatal skeletal muscle development of pig offspring. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1144–1152, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.03.004>

ZHOU, Q. G. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. **Diabetes/metabolism research and reviews**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 459–464, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1002/dmrr.873>

Anexos



ANEXO A

Documento de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FMRP
65 anos 1953-2018

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Interações entre a vitamina D e a angiotensina II no controle do metabolismo de proteínas da musculatura esquelética*", registrado com o número **052/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de junho de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ratos Wistar-OLD machos pesando 130g, 80 ratos Wistar-OLD fêmeas pesando 80g e 288 ratos Wistar Hannover machos pesando 400g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/06/2018 a 10/08/2022.

We certify that the Protocol nº **052/2018**, entitled "*Interactions between the vitamin D and angiotensin II in the control of skeletal muscle protein metabolism*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *06/25/2018*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Wistar-OLD rats weighing 130g, 80 female Wistar-OLD rats weighing 80g, and 288 male Wistar Hannover rats weighing 400g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 08/10/2022.

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2018


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP - USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14069-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br