

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ-CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

CAMILA KUHN

**ESTUDO MORFOLÓGICO DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO
DOS DEDOS DA PROLE DE RATAS OBESAS SUBMETIDAS OU
NÃO À CIRURGIA DE DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE *ROUX***

CASCAVEL- PR

Abril/2018

CAMILA KUHN

**ESTUDO MORFOLÓGICO DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO
DOS DEDOS DA PROLE DE RATAS OBESAS SUBMETIDAS OU
NÃO À CIRURGIA DE DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE *ROUX***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marcia Miranda
Torrejais

COORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Lucinei
Balbo

CASCADEL-PR

Abril/2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA KUHN

**ESTUDO MORFOLÓGICO DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO
DOS DEDOS DA PROLE DE RATAS OBESAS SUBMETIDAS OU
NÃO À CIRURGIA DE DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE ROUX**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Miranda Torrejais
UNIOESTE

Coorientador: Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo
UNIOESTE

Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
UNIOESTE

Profa. Dra. Sonia Bertolini
UEM

CASCADEL-PR

Abril/2018

Dedico este trabalho aos meus professores, à minha mãe Rita e ao meu amor, Ranieri, os quais me incentivaram todos os dias e ofereceram-me apoio nos momentos críticos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta auxiliaram-me a chegar até aqui. Agradeço, principalmente, aos meus professores, desde a graduação até a pós-graduação, que foram meus guias, meus tutores e minhas fontes de inspiração nessa busca constante e interminável do conhecimento. Em especial, à minha orientadora, Marcia Miranda Torrejais, que abriu-me as portas para o mestrado, orientou-me e aconselhou-me nestes dois anos, e à minha coorientadora, Sandra Lucinei Balbo, que foi decisiva nos momentos de dúvidas, incertezas e também apoio. Hoje sei que sou a somatória de cada um de vocês, nos seus jeitos, trejeitos e conhecimento, agradeço infinitamente.

Aos colegas do laboratório (Labem e Biocel), Pâmela, Carol, Matheus, Ariadne, Mylena, Ana e Dinei, que, por tantas vezes, auxiliaram-me na jornada do laboratório e que fizeram este tempo mais prazeroso. Ao pessoal do centro de Microscopia Eletrônica, que me receberam com tanto carinho em Botucatu - SP. Ao José Carlos e ao Adélio, do laboratório de Anatomia, sempre tão prestativos.

E não poderia deixar de agradecer também à minha família. À minha mãe Rita, que nunca mediu esforços para nos incentivar na educação, que além de mãe é amiga. Ao meu pai (*in memoriam*), que onde estiver, tenho certeza que estaria muito orgulhoso de onde cheguei. Às minhas irmãs, Caren e Micaela, que, mesmo longe, se fizeram presentes, mesmo que por ligações telefônicas. E ao meu amor Ranieri, que sempre esteve ao meu lado e foi extremamente paciente nesses anos, por muitas vezes, mesmo a contragosto, aceitando e apoiando minhas decisões, tornou-se meu porto seguro e meu melhor abraço em todos os momentos.

RESUMO GERAL

Estudos apontam que a obesidade materna pode afetar o desenvolvimento fetal, resultando em doenças na vida adulta, tais como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e a própria obesidade. Para reduzir os efeitos da obesidade e as suas comorbidades, as cirurgias bariátricas destacam-se entre as intervenções mais eficazes, sendo a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) o tipo de procedimento bariátrico mais frequentemente realizado. No entanto, ainda são escassos na literatura estudos que avaliem os efeitos da obesidade e das cirurgias bariátricas na morfologia do tecido muscular esquelético da prole adulta. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia e a morfometria das fibras musculares e as junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (ELD) da prole de ratas obesas submetidas ou não à cirurgia de DGYR. Para tanto, ratas *Wistar* de três semanas de vida foram separadas aleatoriamente em três grupos: 1) Controle (CTL), que recebeu dieta padrão; 2) Cafeteria Falso operado (CAF FO) e 3) Cafeteria DGYR (CAF DGYR); esses dois últimos receberam dieta de cafeteria antes e após o procedimento cirúrgico, até o desmame da prole. Na 18ª semana de vida, foi realizado o procedimento cirúrgico e a falsa operação nos grupos CAF DGYR e CAF FO, respectivamente. O cruzamento dos animais ocorreu cinco semanas após o procedimento cirúrgico. O nascimento dos animais foi considerado o dia zero pós-natal e o desmame se deu na terceira semana de vida, quando somente os machos foram separados para o experimento. A prole da primeira geração (F1) foi nomeada em CTL-F1, OB-F1, CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1 e todos os animais receberam dieta padrão. Na 17ª semana, os animais foram eutanasiados e o músculo ELD coletado para análise das fibras musculares e JNMs. Quando analisado os grupos CTL-F1 e OB-F1, esse último apresentou aumento do peso corpóreo, das gorduras retroperitoneal e periepididimal, e relação capilar/fibra. Além disso, houve a redução do número de núcleos, conjuntivo e alterações morfológicas nos parâmetros avaliados na ultraestrutura. A área e diâmetro maior das JNMs também apresentaram redução. A análise entre os grupos CAF DGYR-F1 e CAF FO-F1 evidenciou redução do peso corporal, do peso do músculo ELD, da gordura retroperitoneal e periepididimal, do comprimento nasoanal, da área das fibras e relação núcleo/fibra no grupo CAF DGYR-F1. Esse grupo também apresentou aumento no número de fibras do tipo I e IIa e no número de capilares, assim como redução na área das JNMs e alterações morfológicas na ultraestrutura. Esses resultados demonstram que tanto a obesidade como a cirurgia bariátrica expõem a prole, por meio da programação metabólica, com efeitos na morfologia do tecido muscular esquelético, sendo encontrado maiores agravos na fibra muscular da prole mães submetidas à DGYR.

Palavras-chave: Cirurgia bariátrica, Desenvolvimento Fetal, Fibras musculares esqueléticas, Junção neuromuscular, Obesidade.

GENERAL ABSTRACT

Studies show that maternal obesity can affect fetal development, resulting in diseases in adult life, such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease, obesity itself. To reduce the effects of obesity and its comorbidities, bariatric surgeries stand out among the most effective interventions, with Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) being the most frequently performed type of bariatric procedure. However, there are still few studies in the literature that evaluate the effects of obesity and bariatric surgeries on the morphology of skeletal muscle tissue in adult offspring. Thus, the objective of this study was to evaluate microscopic parameters of muscle fibers and neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus muscle (EDL) in obese rats' offspring submitted or not to RYGB surgery. Three-week Wistar rats were randomly divided into three groups: Control Group (CTL) which received a standard diet; 2) Cafeteria False Operated (CAF FO) and 3) Cafeteria RYGB (CAF RYGB), the latter two received a cafeteria diet before and after the surgical procedure until the weaning of the offspring. In the 18th of life, the surgical procedure and false operation were performed in the CAF RYGB and CAF FO groups, respectively. The mating of the animals occurred five weeks after the surgical procedure. The birth of the offspring was postnatal day 0, and weaning occurred at three weeks of age, and only the male offspring were separated for the experiment. The offspring of the first generation (F1) were named CTL-F1, OB-F1, CAF FO-F1 and CAF RYGB and received standard diet. At 17 weeks the animals were euthanized and the EDL muscle collected for analysis of fiber muscles and NMJs. When the CTL-F1 and OB-F1 groups were analyzed, the latter had an increase in body weight, retroperitoneal and periepididymal fats, and capillary/fiber ratio. Reduction in the number of nuclei, conjunctive and morphological changes in the parameters evaluated in the ultrastructure. The area and larger diameter of NMJs also showed reduction. The analysis between CAF RYGB-F1 and CAF FO-F1 groups showed reduction of body weight, EDL muscle weight, retroperitoneal and periepididymal fat, nasoanal length, fiber area and nuclei/fiber ratio in the CAF RYGB-F1 group. This group also presented increase in the number of fibers of type I and IIa and number of capillaries, as well as reduction in the area of the NMJs and morphological alterations in the ultrastructure. These results demonstrate that both obesity and bariatric surgery expose the offspring, through metabolic programming, to effects on the morphology of skeletal muscle tissue, being found greater aggravations in the muscular fiber of the offspring of mothers submitted to RYGB.

Key Words: Bariatric surgery, Fetal Development, Neuromuscular junction, Obesity, Skeletal Muscle Fibers.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIACÕES	14
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	18
Programação Metabólica.....	18
Obesidade.....	20
Modelos de Indução de obesidade.....	21
Cirurgia Bariátrica.....	23
Músculo estriado esquelético, obesidade e cirurgia bariátrica	26
REFERÊNCIAS.....	33
ARTIGO CIENTÍFICO 1	43
ARTIGO CIENTÍFICO 2	74
ANEXO A.....	98
Certificado do comitê de ética	98
ANEXO B	99
Normas da revista científica International Journal of Development research	99
Anexo C.....	104
Normas da revista científica- Obesity Surgery.....	104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

- Figura 1** Fatores que podem interferir no ambiente uterino e a reposta fetal. 19
- Figura 2** Esquema mostrando a cirurgia mista de DGYR, com redução do volume do estômago e desvio da região intestinal. 25
- Figura 3** Esquema mostrando o músculo esquelético como órgão secretor. Os músculos produzem e liberam miocinas, que funcionam de forma hormonal e exercem efeitos endócrinos específicos em diversos órgãos. 27
- Figura 4** Fibras musculares esqueléticas em corte transversal (**Mt**) e longitudinal (**MI**). Núcleos periféricos das fibras musculares (seta). Endomísio (**En**). Observar as estriações transversais em corte longitudinal e formato cilíndrico em corte transversal. 28
- Figura 5** Junção Neuromuscular. Em (**A**) terminal axonal de um neurônio motor e seu contato com a membrana da fibra muscular, formando a JNM; fenda sináptica, local onde ocorre a liberação do neurotransmissor ACh; (**B**) ACh difundindo-se através da fenda sináptica e ligando-se aos receptores na membrana pós-sináptica 30

ARTIGO CIENTÍFICO 1

- Figura 1** Photomicrographs of the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Cross-section. A and B: Muscle fibers (asterisk), peripheral nuclei (white arrow), and blood capillaries (black arrow) in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1), respectively. HE. C and D: Perimysium (asterisk) in CTL-F1 and OB-F1, respectively. Masson's trichrome. 68

- Figura 2** Photomicrographs of the extensor digitorum longus muscle of 69 Wistar rats at 17 weeks of age. Cross-section, NADH-TR reaction. A and B: Types I, IIa and IIb muscle fibers in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1), respectively. C and D: Area and number of the different muscle fibers types in animals of the CTL-F1 and OB-F1 groups. Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Student *t*-test.
- Figura 3** Electron micrographs of the extensor digitorum longus muscle 70 of Wistar rats at 17 weeks of age. Longitudinal section. A: Preserved muscle fiber with organized sarcomere (S), A-band (A), I-band (I), and Z-line (white arrow). Rat offspring born to control dams (CTL-F1). B: Muscle fiber showing disorganization of the Z-line (white arrow), myofibrillar disorganization (key), and dissolution of the Z-line (arrowhead). Rat offspring born to obese dams (OB-F1).
- Figura 4** Photomicrographs of the neuromuscular junctions (NMJs) of 71 the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Longitudinal section, nonspecific esterase reaction. A and B: Observe the morphological characteristics of NMJs in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and offspring born to obese dams (OB-F1), respectively. C, D and E: Area, largest diameter and smallest diameter of NMJs in animals of the CTL-F1 and OB-F1 groups. Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Student *t*-test. *** $p < 0.0006$.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

- Figura 1** Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* com 17 93 semanas de vida. Secção transversal. A e B: Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos (seta branca) e capilares sanguíneos (seta preta) dos grupos prole de ratas

cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. HE. C, D, E, F, G e H, dados de área das fibras, número de fibras, número de núcleos, relação núcleo/fibra, número de capilares e relação capilar/fibra dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1, respectivamente. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*.

Figura 2 Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* com 17 94
semanas de vida. Secção transversal. A e B: Perimísio (cabeça de seta) dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1). Tricrômico de Masson.

Figura 3 Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 95
semanas. Secção transversal, reação de NADH-TR. A e B: Fibras musculares dos tipos I, IIa e IIb nos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. C e D: Dados da área e contagem dos diferentes tipos de fibras musculares nos animais dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*.

Figura 4 Eletromicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 96
semanas. Secção longitudinal. A e B: Fibra muscular com as estruturas do sarcômero (S), banda A (A), banda I (I) e linha Z (seta branca), desorganização da linha Z (seta curva), desorganização miofibrilar (chave) e dissolução da linha Z (cabeça de seta). Grupo prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente.

Figura 5 Fotomicrografias das junções neuromusculares (JNMs) no 97
músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 semanas. Secção longitudinal, reação de Esterase Inespecífica. A e B: Observar as características morfológicas das JNMs dos grupos prole de

ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. C, D e E: Dados de área, diâmetros maior e menor das JNMs dos animais dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 1

- Tabela 1** Nutritional composition of the ingredients of the cafeteria diet. 65
- Tabela 2** Macroscopic parameters of rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1) at 17 weeks of age. 66
- Tabela 3** Microscopic parameters of the EDL muscle of rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1) at 17 weeks of age. 67

ARTIGO CIENTÍFICO 2

- Tabela 1** Composição nutricional dos alimentos da dieta de cafeteria 91
- Tabela 2** Parâmetros macroscópicos dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1) com 17 semanas de vida 92

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh- Acetilcolina
ATP- adenosinatrifosfato
CAF DGYR- Cafeteria cirurgia de derivação gástrica em Y de *Roux*
CAF DGYR- F1- Prole de ratas cafeteria cirurgia de derivação gástrica em Y de *Roux*
CAF FO- Cafeteria falso operado
CAF FO-F1- Prole de ratas cafeteria falso operado
CEUA- Comitê de Ética no uso de animais
CTL- Controle
CTL F1- Prole de ratas controle
DGBP- Derivação gástrica biliopancreática-duodenal
DGYR- Derivação gástrica em Y de *Roux*
DM2- Diabetes mellitus tipo 2
ELD- Extensor longo dos dedos
F1- Prole de primeira geração
FO- Falso operado
HE- Hematoxilina-Eosina
IGF1- Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-6- Interleucina 6
IMC- Índice de massa corporal
JNM- Junção neuromuscular
JNMs- Junções neuromusculares
MSG- Glutamato monossódico
NADH-TR- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OB- Obeso
OB-F1- Prole de mães obesas
TNF α - Fator de necrose tumoral alfa
UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Unioeste- Universidade Estadual do Oeste do Paraná

INTRODUÇÃO GERAL

Recentemente, a preocupação com as doenças que acometem os adultos e a sua relação com a vida uterina vem se destacando. O feto é um reflexo da nutrição e da composição corporal, dos suprimentos e da energia recebida da mãe (RIBEIRO et al., 2015). Além disso, as alterações moleculares que ocorrem no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou nas proteínas as quais está estreitamente ligado são chamadas de mecanismos epigenéticos e são induzidas por fatores ambientais, tais como dieta materna, e transmitidas a gerações seguintes. Dessa forma, as perturbações que ocorrem durante o período fetal podem interferir na vida adulta por meio da programação metabólica (BARKER, 2004). Assim, a obesidade materna bem como suas comorbidades podem acarretar em mudanças permanentes nas questões fisiológicas e metabólicas dos filhos, refletindo em incidência de desordens metabólicas na vida adulta (DIJK et al., 2015; GUDSNUK; CHAMPAGNE, 2011).

A obesidade vem apresentando evolução crescente e alarmante tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, resultando em impactos negativos na saúde humana, o que desencadeia repercussões orgânicas como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), desordens reprodutivas, afetando, também, as questões psicossociais (ARAÚJO, 2012; AUNE et al., 2016; LIND et al., 2016). A obesidade ocorre quando há o desequilíbrio entre consumo alimentar e o gasto energético, resultando em acúmulo de tecido adiposo. Modificações na dieta alimentar, tais como a ingestão de alimentos gordurosos, altamente energéticos, e o sedentarismo, destacam-se entre os fatores casuísticos do crescimento da prevalência desse aumento (MILAGRO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Dessa forma, a preocupação com a obesidade e as suas comorbidades é universal, logo, adotar formas de prevenção e intervenção é fundamental para que se minimizem os custos gerados ao setor público (NG et al., 2016; PATTI, 2013). Nesse escopo, as intervenções cirúrgicas são uma opção no controle da obesidade, especialmente com a redução do peso, mas também com a melhora das comorbidades (ARAPIS et al., 2015). Uma das cirurgias mais frequente é a Derivação Gástrica em Y de *Roux* (DGYR)

(MOSINKI; KIRWAN, 2016; SPANIOLAS; PORIES, 2016). A técnica consiste em duas abordagens cirúrgicas que consistem na redução do volume gástrico e no desvio intestinal; é considerada uma técnica mista, a qual reduz a ingestão e a absorção de nutrientes (ARAPIS et al., 2015).

Dentre as comorbidades associadas à obesidade, encontra-se as alterações musculoesqueléticas. O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo, com funções fisiológicas importantes; por isso, as disfunções decorrentes da obesidade causam prejuízos físico e metabólico (LE et al., 2014). Em indivíduos obesos, o músculo deve executar suas funções sob condições de aumento da massa corporal, que pode gerar alterações morfológicas e bioquímicas, como a redução de proteínas do citoesqueleto e ribossomos mitocondriais (CAMPBELL et al., 2016; KEMP et al., 2009; WOO et al., 2016).

A estrutura muscular é composta por uma matriz extracelular rica em carboidrato e proteína. Todavia, em indivíduos obesos, o excesso de tecido adiposo intramuscular libera mediadores inflamatórios sistêmicos e locais como a Interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α), os quais, associados a fatores mecânicos, levam a deficiências musculoesqueléticas, tais como a osteoartrite, a dor musculoesquelética e a redução da capacidade física (EL-KHANI et al., 2014). Além disso, a hipertrofia das células adiposas presente entre as fibras musculares prejudica a síntese de proteína do músculo, predispondo, por exemplo, o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o que leva também à deficiência na capacidade oxidativa e à remodelação estrutural das fibras musculares (KEMP et al., 2009; PELLEGRINELLI, et al., 2015).

O músculo estriado esquelético se remodela devido ao uso, ao desuso e às doenças como a obesidade. Entender as consequências da obesidade a partir de seus efeitos no tecido muscular, bem como as intervenções com relação à obesidade, permitem melhorar as abordagens realizadas, evitando, desse modo, o efeito da programação metabólica neste tecido e consequências para descendentes de mães obesas.

Sabendo-se que músculo extensor longo dos dedos (ELD) é composto principalmente por fibras do tipo II, sendo elas mais suscetíveis aos

agravos nutricionais (WARD; STICKLAND, 1991), e a obesidade e os procedimentos cirúrgicos comprometem fisiologicamente o metabolismo e que características das mães são transmitidas à prole por meio da programação metabólica e devido também, há uma lacuna na literatura no que diz respeito à análise desses fatores. Diante disso, este estudo buscou avaliar os efeitos da obesidade e da cirurgia de DGYR no músculo estriado esquelético da prole de ratas obesas submetidas ou não à cirurgia bariátrica.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Programação Metabólica

A programação metabólica pode ser definida “como alterações estruturais e funcionais que ocorrem no feto em respostas a estímulos que ocorrem em períodos considerados críticos do desenvolvimento”. Esse termo foi desenvolvido por Barker, em sua proposta de origem fetal das doenças, na qual órgãos e sistemas do corpo são “plásticos” e sensíveis às perturbações do meio ambiente. Segundo o pesquisador, para esses órgãos, o período crítico ocorre no útero, principalmente no primeiro trimestre gestacional (BARKER, 2004; RIBEIRO et al., 2015).

O metabolismo materno pode afetar o fenótipo dos filhos, gerando a programação para o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (ALFARADHI et al., 2014; MACMILLEN; ROBINSON, 2005; PARLEE; MACDOUGALD, 2014). Dessa forma, o tabagismo, a hipertensão, a desnutrição e a obesidade materna podem comprometer o metabolismo de seus descendentes (CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015; EBERLE; AMENT, 2012).

A exposição a essas perturbações modifica o desenvolvimento do feto por meio de fatores conhecidos como mecanismos epigenéticos, que compreendem alterações moleculares que ocorrem no DNA ou nas proteínas as quais ele está estreitamente ligado, sem modificar sua sequência, e podem ser transmitidas a gerações seguintes (DIJK et al., 2015; GUDSNUK; CHAMPAGNE, 2011).

Nesse sentido, é crescente a preocupação do reflexo da nutrição, da composição corporal e os suprimentos que podem ser transmitidos da mãe para o feto (RIBEIRO et al., 2015). Assim sendo, os eventos que ocorrem na vida uterina são capazes de interferir na vida adulta (Figura 1).

Em decorrência disso, a obesidade materna, bem como as suas comorbidades, podem acarretar em mudanças fisiológicas e metabólicas permanentes nos filhos (CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015). Portanto, entre os diversos fatores casuísticos da obesidade, a programação metabólica e os mecanismos epigenéticos têm se tornado aspectos a influenciar fenotipicamente o surgimento da obesidade e comorbidades (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

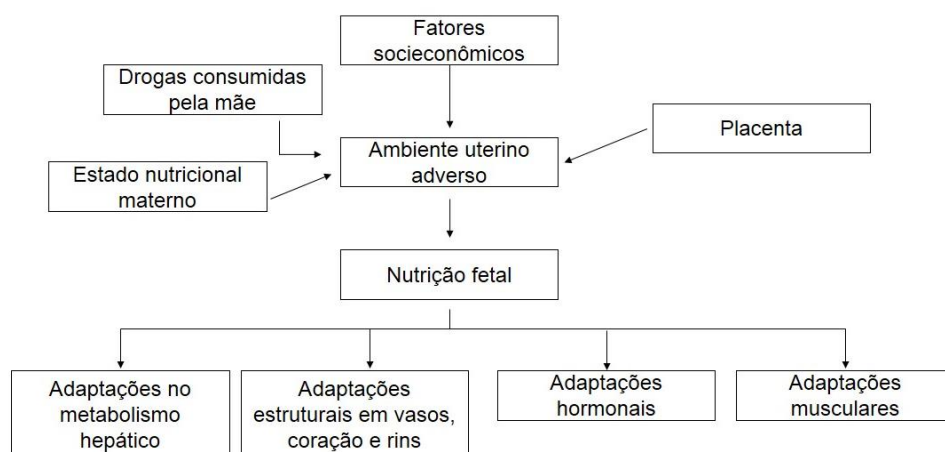


Figura 1. Fatores que podem interferir no ambiente uterino e a resposta fetal. Adaptado de Ribeiro et al., 2015.

Como observado na Figura 1 as adaptações musculares podem ocorrer como resposta ao ambiente uterino adverso. Ademais, sabe-se que o período fetal é crucial para o desenvolvimento do músculo esquelético, haja vista que as suas propriedades morfofuncionais são determinadas durante a embriogênese. O estado epigenético das células musculares pode ser alterado pela nutrição e obesidade materna, predispondo a prole a obesidade na vida adulta (BAAR, 2010; DU et al., 2010).

É notório que as exposições ambientais modulam os fatores epigenéticos, resultando em programação metabólica, dentre essas, a obesidade pode ser destacada, pois, além de poder ser transmitida geneticamente, suas comorbidades também afetam seus descendentes.

Obesidade

O aumento da obesidade nas últimas décadas é preocupante, tornando-se um problema de saúde pública, porque sobrecarrega o sistema público com o tratamento das enfermidades associadas a essa condição. A doença é uma condição crônica e tem como principal característica o excesso de tecido adiposo no indivíduo, sendo então definida como o excesso de peso corporal, que resulta do desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético, e está associada a fatores de risco genético, nutricionais, metabólicos e ambientais (BERNARDES et al., 2009; DE LORENZO et al., 2016; MILAGRO et al., 2013).

A doença está geralmente associada a indivíduos que apresentam baixo índice de atividade física, em que as atividades laborais implicam em baixo gasto energético, o comportamento sedentário da profissão contribui para sua condição (OLIVEIRA et al., 2015). Outro fator relevante que pode interferir no peso corporal são as relações interpessoais. O consumo de alimentos industrializados e o estilo de vida podem ser influenciados pelo convívio social, familiar e ambiental (JALALI et al., 2016).

Os fatores genéticos também devem ser considerados na etiologia da obesidade, dado que o risco de desenvolver a morbidade quando nenhum dos progenitores é obeso é de 9%. Por outro lado, quando um dos pais é obeso o percentual eleva-se para 50%, atingindo 80% quando ambos os pais são obesos, associadas em maior ou menor porcentagem aos fatores ambientais (ABESO, 2009; PIMENTA et al., 2015;).

Estratégias de monitoramento são adotadas para estimar seu crescimento. Dentre as medidas comumente adotadas encontram-se o exame de bioimpedância, a circunferência da cintura e a relação cintura-quadril. No entanto, o índice de massa corporal (IMC, doravante) é amplamente utilizado como parâmetro da obesidade e sobrepeso, e é obtido pelo cálculo do peso do indivíduo em quilogramas (Kg) dividido pelo quadrado de sua altura em metros (m²), em que IMC igual ou acima de 25 é considerado sobrepeso (IMC \geq 25) e IMC maior ou igual a 30 é considerado obesidade (IMC \geq 30) (PEREIRA et al., 2015; WHO, 2015). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstra

que em 2014, 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesas (WHO, 2015). No Brasil, os dados são ainda mais alarmantes, onde em 2013, 16,8% dos homens e 24,4% das mulheres foram diagnosticados como obesos (BRASIL, 2015).

Associado à obesidade é preocupante também o desenvolvimento das comorbidades, tais como distúrbios do aparelho locomotor, DM2, doenças cardiovasculares, câncer e dislipidemia. O surgimento das doenças associadas, além de comprometer o desenvolvimento de seus descendentes, eleva também a taxa de mortalidade dos indivíduos obesos (AUNE et al., 2016; BERNARDES et al., 2009; FINUCANE et al., 2011).

Diante da preocupação com a obesidade e a programação metabólica, o estudo desenvolvido por Bayol, Simbi e Stickland (2005) mostra que a dieta materna tem papel fundamental no desenvolvimento saudável dos filhos. O estudo mostrou que ratas *Wistar* expostas à dieta de cafeteria resultou em alterações no músculo esquelético da prole logo ao desmame, com redução de 25% da área da secção transversal do músculo e redução de 20% no número de fibras, além de hipertrofia dos adipócitos intramusculares da prole de ratas obesas em comparação com a prole de mães tratadas com dieta padrão (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005).

Com base nesses dados, depreende-se que identificar quais são e como atuam os mecanismos relacionados a programação metabólica é provavelmente um dos melhores meios para evitar o surgimento de doenças na vida adulta (MILAGRO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015). Sendo assim, o uso de modelos animais no meio científico é um meio na busca por tais indagações.

Modelos de Indução de obesidade

O estudo clínico com seres humanos muitas vezes esbarra em questões éticas, financeiras e metodológicas. Por isso, modelos com roedores foram adotados como meio primário de investigação experimental (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006; HALL et al., 1993).

O uso desses modelos ajuda na compreensão dos mecanismos que desencadeiam a obesidade e as suas comorbidades, dentre eles os mais

utilizados são oriundos de dois grupos principais: animais geneticamente modificados para o seu desenvolvimento e animais que apresentam a doença após manipulação dietética ou farmacológica (NAGARAJAN et al., 2012).

Os animais geneticamente modificados, como, por exemplo, os camundongos *ob/ob* (com mutação no gene *ob*), apresentam níveis reduzidos do hormônio secretado pelos adipócitos, a leptina. Relacionada à redução do apetite, essa alteração genética provoca um quadro de hiperfagia e, conseqüentemente, de obesidade. Contudo, esses modelos de animais geneticamente modificados não se assemelham a humanos, uma vez que a ocorrência de indivíduos obesos devido a modificações genéticas é rara (ROSSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

Dentre os modelos de indução de obesidade após manipulação farmacológica ou dietética presentes na literatura, a lesão no núcleo arqueado (realizada mediante administração subcutânea, em ratos neonatos, de glutamato monossódico – MSG) e a dieta hiperlipídicas e hipercalóricas podem ser destacadas (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Embora os modelos mencionados se mostrarem eficazes no estabelecimento da doença, a dieta hipercalórica e o sedentarismo são os principais desencadeadores da obesidade em humanos (ROSSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

O padrão de alimentação adotado pela sociedade moderna é rico em gordura e açúcar, o qual, associado ao estilo de vida sedentário (em termos de lazer, transporte e trabalho), culminam para prevalência de obesidade. Um modelo animal que consiste em uma dieta composta dos mesmos alimentos adotados pela sociedade é chamado de dieta de cafeteria, ou dieta ocidental, no qual os animais experimentais preferem esses alimentos em relação à ração padrão, e o seu elevado consumo resulta em obesidade (MARTIRE et al., 2013).

A dieta hipercalórica do tipo cafeteria usada para indução da obesidade consiste ao acesso livre dos animais, além da dieta padrão (3,8 Kcal/g: 70% de carboidrato, 20% de proteína e 10% de gordura), aos líquidos e alimentos hipercalóricos selecionados, como refrigerante, biscoitos, chocolates, bolos, embutidos (5,4 Kcal/g: 38,5% de carboidrato, 15% de proteína e 46,5% de

gordura). Esse tipo de dieta tem a capacidade de promover no animal hiperfagia voluntária, e, devido ao maior aporte calórico, culmina para rápido aumento de peso e de gordura (ARAÚJO et al., 2012; DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006; SAMPEY et al., 2011).

As dietas, desse modo, desencadeiam nos animais a síndrome metabólica, reproduzindo a etiologia, o curso e os resultados de doenças metabólicas em seres humanos (HIGA et al., 2014). Considerando que o modelo deve ser o mais próximo do que ocorre em seres humanos, a indução da condição de obesidade por meio do consumo de alimentos palatáveis e com alto valor energético se torna mais apropriada (NASCIMENTO et al., 2008).

Como as modificações na alimentação materna, com aumento na ingestão de alimentos hipercalóricos, determinam a suscetibilidade de doenças na vida adulta, pesquisadores concluíram que a ingestão de alimentos hipercalóricos por ratas durante a gravidez e a lactação desencadearam na prole aumento do peso corporal e níveis de colesterol total, bem como resistência à insulina. Os dados demonstram, então, que o modelo de obesidade com dietas que ofereçam maior aporte calórico também afeta o metabolismo da prole (ZHENG et al., 2014).

Sendo assim, a adoção de meios que possam contribuir para o controle da obesidade e das comorbidades associadas se mostram importantes.

Cirurgia Bariátrica

Como forma de controlar o crescente aumento da obesidade em todo o mundo, algumas opções de controle de peso são utilizadas, tais como uso de fármacos, dieta, intervenções comportamentais, cirurgias bariátricas e abordagens que combinam múltiplas intervenções (BEAULAC; SANDRE, 2016).

No entanto, os métodos preventivos da obesidade e as abordagens farmacológicas são muitas vezes ineficazes. Nessa direção, as abordagens cirúrgicas surgiram como opção favorável para o enfrentamento da doença. Embora o método cirúrgico ideal ainda permaneça controverso, a cirurgia bariátrica evoluiu consideravelmente se tornando um método eficiente para a

perda de peso e para a melhora das comorbidades em obesos mórbidos (JALILVAND et al., 2016; LAGER et al., 2016).

Com relação aos tipos de intervenções cirúrgicas, esses podem ser divididos em três categorias: do tipo restritivos, disabsortivos e mistos. As cirurgias do tipo restritivas consistem na redução do volume do estômago, redução essa que gera sensação de saciedade com menor quantidade de alimentos ingeridos. Exemplos desse tipo de cirurgia compreendem o balão intragástrico, bandagem gástrica por vídeo e gastroplastia vertical com bandagem. As cirurgias do tipo disabsortivas, que incluem o desvio duodeno-jejunal, jejunoileal e biliopancreático, levam a alterações no trato intestinal, acarretando em diminuição na absorção de nutrientes. Por fim, os procedimentos do tipo misto (Figura 2), envolvem alterações no estômago e no intestino, reduzindo a ingestão e absorção dos alimentos. Exemplos desse tipo de cirurgia são a derivação gástrica de Y de *Roux* (DGYR) e a derivação gástrica biliopancreática-duodenal (DGBP) (DEJÁRDIN et al., 2004; KARRA; YOUSSEIF; BATTERHAM, 2010).

Na cirurgia de DGYR, a restrição é realizada pela remoção de parte do estômago, reduzindo seu volume e formando uma bolsa gástrica com o estômago excluído. A disabsorção, então, é realizada por meio da divisão do intestino delgado, dando origem a uma alça alimentar (Alça de Roux) e outra biliopancreática (ACQUAFRESCA et al., 2015; ARAPIS et al., 2015).

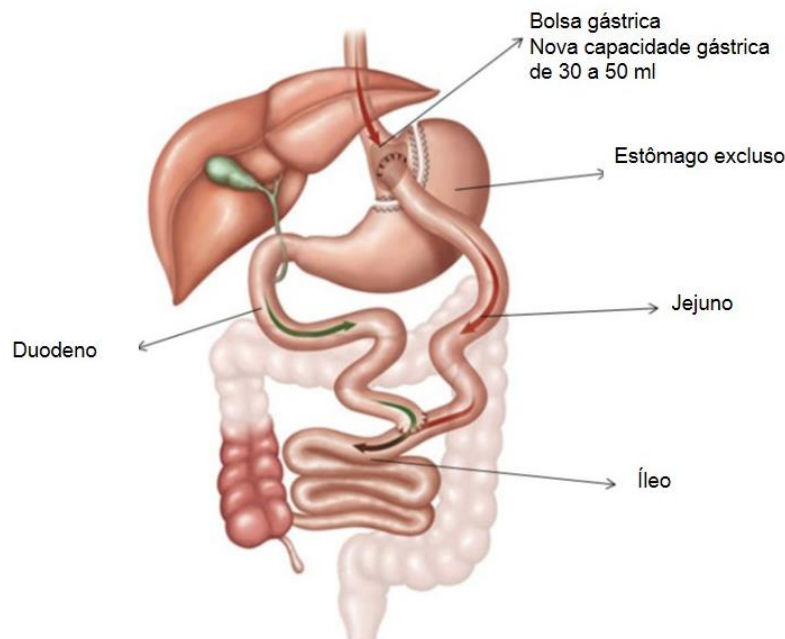


Figura 2. Esquema mostrando a cirurgia mista de DGYR, com redução do volume do estômago e desvio da região intestinal. Seta vermelha demonstrando a alça alimentar (via de passagem dos alimentos) e seta verde demonstrando a alça bilopancreática (via de passagem para as secreções do pâncreas e fígado). (Adaptado Bordalo; Mourão; Bressan, 2011).

O uso de modelos experimentais na cirurgia bariátrica, como a DGYR, é mais barato e pode oferecer conhecimento e compreensão dos efeitos fisiológicos pós-cirúrgicos. Entretanto, no treinamento de habilidades, requerem técnicas de microcirurgias e não representam as mesmas habilidades utilizadas nas cirurgias humanas (ASHRAFIAN et al., 2010; RAO; RAO; KINI, 2010).

Apesar da cirurgia bariátrica ser uma opção no tratamento da obesidade, alguns riscos associados aos descendentes de mães operadas podem estar presentes. A prematuridade e menor peso ao nascer são os achados mais comuns dentre os filhos de mães submetidas à cirurgia bariátrica, no entanto, é preocupante o risco aumentado de anomalias congênitas entre os descendentes, vinculados principalmente às deficiências nutricionais, particularmente nas cirurgias disabsortivas (GRAYSON et al., 2013; JOSEFSSON et al., 2013).

Sabe-se que a cirurgia bariátrica de DGYR acarreta em redução na absorção de macronutrientes, como carboidratos e proteínas, o que pode comprometer o metabolismo das células e tecidos fetais, como o músculo estriado esquelético, composto principalmente por proteínas (ALVES; DÂMASO;

DAL PAI, 2008; GRAYSON et al., 2013). Todavia, os efeitos da cirurgia bariátrica nos descendentes de mães operadas não estão totalmente elucidados (MONSON; JACKSON, 2016).

Músculo estriado esquelético, obesidade e cirurgia bariátrica

Cerca de 40% do corpo humano é constituído por músculo esquelético, o qual é composto principalmente de água (75%), proteína (20%) e substâncias como sais inorgânicos, minerais, gorduras e carboidratos (5%). Está também relacionado com a regulação das respostas motoras para o desempenho de atividades físicas diárias e manutenção da postura. Além disso, ele tem função fisiológica, funcionando como órgão secretor de aminoácidos e proteínas, chamadas de miocinas, que têm importantes efeitos em outros órgãos como fígado, pâncreas, entre outros (Figura 3). Portanto, alterações em suas estruturas acarretam em disfunções físicas e metabólicas (BIOLO; CEDERHOLM; MUSCARITOLI, 2014; FRONTERA; OCHALA, 2015; RISSI et al., 2016).

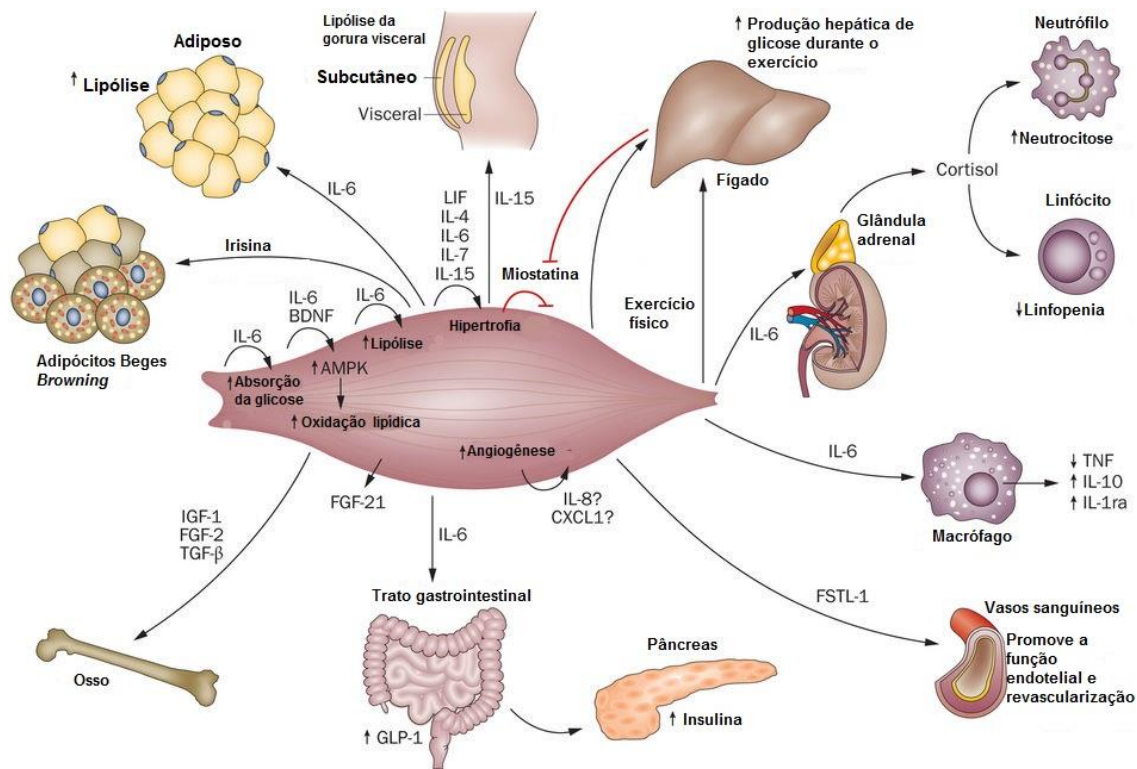


Figura 3. Esquema mostrando o músculo esquelético como órgão secretor. Os músculos produzem e liberam miocinas, que funcionam de forma hormonal e exercem efeitos endócrinos específicos em diversos órgãos (Adaptado PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012).

Dentre as propriedades da fibra muscular destacam-se a sua capacidade contrátil e a presença de vários núcleos situados próximos ao sarcolema. Cada núcleo é responsável por sintetizar as proteínas específicas daquela região celular, determinando, assim, os domínios mionucleares, que são altamente regulados; porém, não constantes (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; FRONTERA; OCHALA, 2015).

O sarcoplasma da fibra muscular é constituído, além da matriz citoplasmática típica, por miofibrilas. Essas são estruturas cilíndricas e alongadas, responsáveis por gerar a contração muscular, e são formadas por agrupamentos de filamentos grossos e finos paralelos entre si. Seu padrão de organização transversal forma as estriações transversais do músculo estriado esquelético, e a disposição em unidades idênticas os sarcômeros (Figura 4) (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

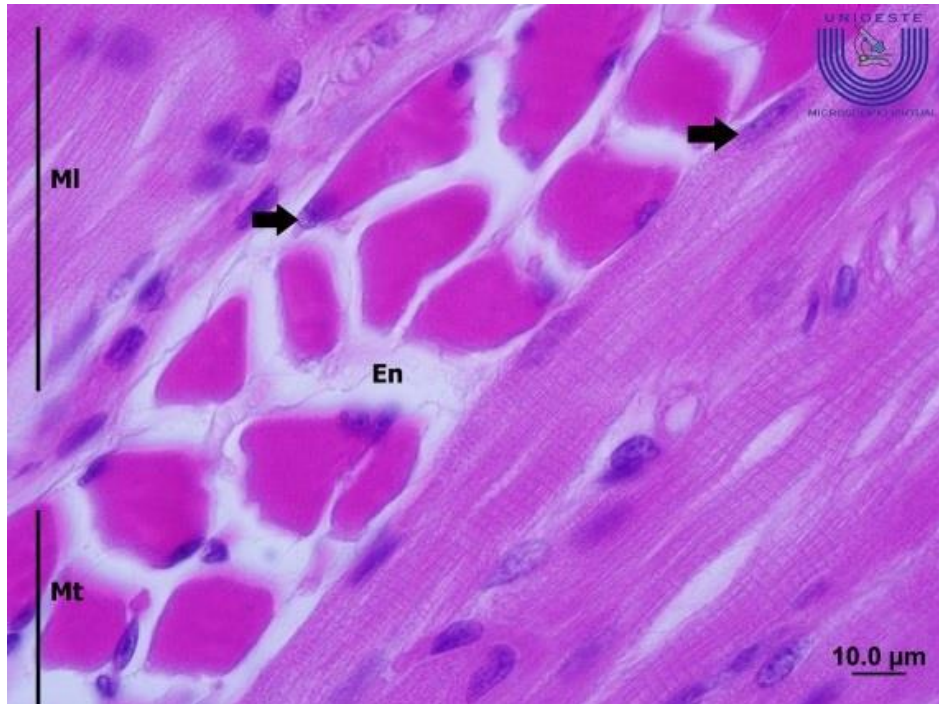


Figura 4: Fibras musculares esqueléticas em corte transversal (**Mt**) e longitudinal (**MI**). Núcleos periféricos das fibras musculares (seta). Endomísio (**En**). Observar as estriações transversais em corte longitudinal e formato cilíndrico em corte transversal (BRANCALHÃO et al., 2016).

A propriedade contrátil do tecido muscular não depende apenas das miofibrilas, haja vista que o tecido conjuntivo que o envolve é responsável por transmitir a força de contração do músculo para os tendões e ossos, e representa sua matriz extracelular (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). A camada que recobre o tecido como um todo é chamada de epímísio; em seu interior, o tecido conjuntivo forma septos, chamados de perímísio, que o divide em fascículos; localizado mais profundamente e circundando cada fibra muscular individualmente, encontra-se o endomísio. Além da transmissão da força, o tecido conjuntivo tem funções de manter as fibras unidas, auxiliando também na miogênese, regeneração e reinervação muscular. Remodelações ocorrem em suas estruturas diante de lesões e de patologias (GILLIES; LIEBER, 2011; MARTINEZ-HUENCHULLAN et al., 2017).

As fibras musculares apresentam características funcionais e morfológicas distintas entre si (SCHIAFINNO; REGGIANI, 2011). Três tipos principais de fibras podem ser encontrados, e a sua classificação pode ser feita de acordo com a reação para a atividade da ATP (adenosinatrifosfato) miofibrilar.

As fibras do tipo I têm baixa capacidade de hidrolisar a ATP. Sendo consideradas fibras de contração lenta, as fibras do tipo IIb têm rápida hidrólise da ATP, e são consideradas fibras de contração rápida. Já as fibras do tipo IIa respondem de forma intermediária na hidrólise da ATP (BROOKE; KAISER, 1970; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

As isoformas da cadeia pesada da miosina são o principal determinante na velocidade de contração, de força e de gasto energético das fibras musculares. As fibras do tipo I contêm maior quantidade de cadeias pesadas de miosina com isoforma do tipo I, já as fibras do tipo II contêm maior quantidade de cadeia pesada com isoforma de miosina do tipo II. A diferença no gasto de energia corresponde a utilização da glicose ou gordura como combustível para gerar contração. Dessa forma, as fibras do tipo I são fibras de contração lenta e utilizam de ácidos graxos como fonte de energia, em contrapartida as fibras do tipo II apresentam contração rápida utilizando a glicose como fonte de energia (BALDWIN et al., 2011).

Essas propriedades estruturais e funcionais das fibras são chamadas de fenótipo da fibra, e podem sofrer influência diante patologias, ação hormonal e neural, sendo a neuroatividade um dos principais determinantes do tipo de fibra (FRONTERA; OCHALA, 2015; SCHIAFINNO; REGGIANI, 2011).

A conexão sináptica entre neurônios motores e fibras musculares é chamada de Junção Neuromuscular (JNM, doravante) (BLOCH-GALLEGO, 2015). A JNM é responsável pela transmissão química a partir do impulso elétrico no nervo para o músculo, gerando a contração muscular. Sua arquitetura especializada permite a liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) para desencadear o mecanismo de contração muscular (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009).

A membrana pré-sináptica da JNM consiste no neurônio motor, que tem seu corpo celular no corno anterior da medula espinal e se projeta por meio de seus axônios mielínicos para inervar a fibra muscular; em sua parte terminal, os axônios apresentam o neurotransmissor ACh. Ao se aproximar do músculo, o neurônio motor perde sua bainha de mielina, sendo envolto apenas pela célula de Schwann. A fenda sináptica é o espaço existente entre a membrana pré-

sináptica (terminal axonal) e a membrana pós-sináptica (fibra muscular), onde ocorre a degradação da ACh pela acetilcolinesterase. A membrana pós-sináptica corresponde à membrana do músculo, que contém ondulações ou invaginações, correspondentes às dobras juncionais, local onde estão localizados os receptores para ACh (Figura 5) (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009).

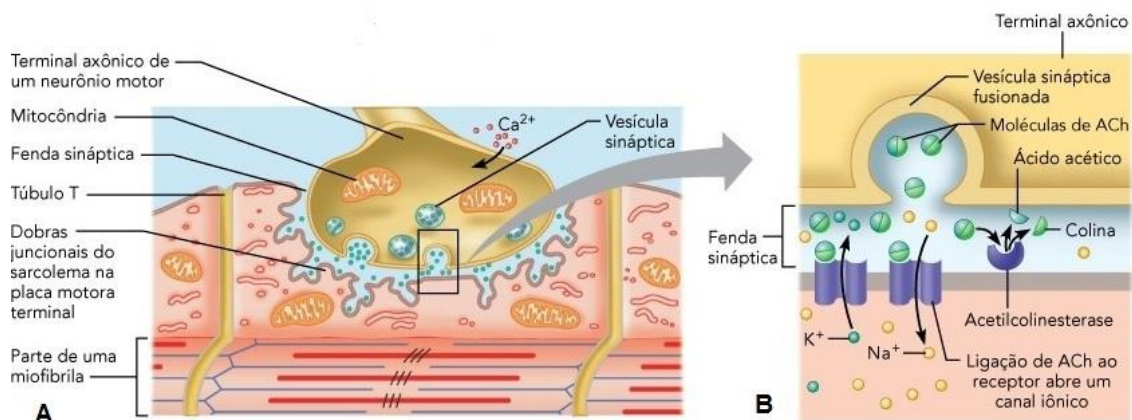


Figura 5: Junção Neuromuscular. Em (A) terminal axonal de um neurônio motor e seu contato com a membrana da fibra muscular, formando a JNM; fenda sináptica, local onde ocorre a liberação do neurotransmissor ACh; (B) ACh difundindo-se por meio da fenda sináptica e ligando-se aos receptores na membrana pós-sináptica (Adaptado, MARIEB; HOEHN, 2009).

A integridade morfológica e funcional do tecido muscular têm relação direta com a saúde do indivíduo. Nesse sentido, entender os mecanismos fisiológicos e patológicos aos quais os músculos estão submetidos é imprescindível no que concerne à homeostase orgânica (BENTON; WHYTE; DYAL, 2011). Respostas adaptativas ocorrem em seu metabolismo e função em resposta a estímulos externos, como carga mecânica, hipóxia e nutrição (SILVENNOINEN et al., 2013). Tanto a desnutrição (ALVES; DÂMASO; DALPAI, 2008) como a obesidade (KELLEY; GOODPASTER, 2001) promovem alterações nas características morfológicas, metabólicas e contráteis das fibras musculares.

O acúmulo de gordura intramuscular libera mediadores pró-inflamatórios sistêmicos e locais como a interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que, além da inflamação local, combinado com fatores mecânicos, acarreta em prejuízo musculoesquelético como dor

musculoesquelética e osteoartrite, resultando em consequências ocupacionais e de estilo de vida (EL-KHANI et al., 2014).

Em indivíduos obesos, o aumento do volume muscular leva ao músculo cumprir suas funções com atividade reduzida, gerando alterações morfológicas e bioquímicas, interferindo no desempenho e contratilidade muscular (KEMP et al., 2009). O aumento de adiposidade acarreta em mudanças na composição das fibras musculares, indivíduos obesos apresentam menor proporção de fibras do tipo I (DENIES et al., 2014; HICKEY et al., 1995; TANNER et al., 2002; WADE; MARBUT; ROUND, 1990), o que, por sua vez, resulta em função metabólica deficiente (DENIES et al., 2014). Em humanos obesos, pesquisadores também encontraram menor proporção de fibras do tipo I, e indivíduos obesos que apresentaram maior proporção de fibras do tipo I tendem a perder mais peso após cirurgia bariátrica (TANNER et al., 2002).

A alimentação com maior aporte calórico também promove alterações morfológicas nas fibras musculares. Pesquisadores observaram em camundongos redução da área, do número de células satélites e de núcleos das fibras musculares do músculo gastrocnêmio após exposição à dieta hiperlipídica (LEE et al., 2015). Foi observada, ainda, atrofia significativa do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* submetidos à dieta de cafeteria, com redução na área transversal e apoptose da fibra muscular (SISHI et al., 2010).

Sendo o músculo esquelético um tecido com capacidade dinâmica, a indução da obesidade fornece um modelo importante para estudos de como as disfunções musculares contribuem para certas doenças, sobretudo, para entender como essas condições afetam o próprio músculo (DENIES et al., 2014).

Estudos que avaliem os aspectos morfológicos das fibras musculares após cirurgias bariátricas são escassos. Ulsenheimer et al. (2017) observaram redução do colágeno no diafragma de ratos obesos submetidos a derivação duodeno-jejunal (DDJ). A avaliação ultraestrutural também demonstrou desorganização das miofibrilas e linha Z, presença de gotículas de gordura nos ratos obesos expostos a falsa operação e de ratos obesos submetidos a DDJ.

Sabendo-se que o feto é um reflexo da nutrição e composição corporal, dos suprimentos e da energia recebida da mãe (RIBEIRO et al., 2015), e que perturbações durante o período gestacional podem resultar em anormalidades metabólicas, por meio da programação metabólica (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015) e que o músculo estriado esquelético desempenha papel chave nas atividades metabólicas e físicas do indivíduo, entender o comportamento das fibras musculares na obesidade e após as intervenções bariátricas podem ajudar a compreender como essas condições afetam, não somente o músculo, mas também as funções por ele desempenhadas.

REFERÊNCIAS

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010**. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf>. Acesso em: 17 de jan. 2018.

ACQUAFRESCA, P.A.; PALERMO, M.; ROGULA, T.; DUZA, G.E.; SERRA, E. Complicações após bypass gástrico: Revisão da literatura. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 28, n. 1, p. 74-80, 2015.

ALFARADHI, M.Z.; FERNANDEZ-TWINN, D.S.; MARTIN-GRONERT, M.S.; MUSIAL, B.; FOWDEN, A.; OZANNE, S.E. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. **American Journal of Psychologic Society**, v. 307, n. 1, p. 26-34, 2014.

ALVES, A.P.; DÂMASO, A.R.; DAL PAI, V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264-271, 2008.

ARAPIS, K.; GILLARD, L.; CLUZEAUD, F.; LETTÉRON P.; DUCROC, R.; BEYEC, J.L.; HOURSEAU, M.; COUVELARD, A.; MARMUSE, J.P.; GALL, M.L.; BADO, A. Remodeling of the residual gastric mucosa after Roux-En-Y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-18, 2015.

ARAÚJO, A.C.; BONFLEUR, M.L.; BALBO, S.L.; RIBEIRO, R.A.; DE FREITAS, A.C. Duodenal-jejunal bypass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in Western diet obese rats. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 5, p. 819-826, 2012.

ARAÚJO, R.P.C. A importância dos aspectos interdisciplinares da obesidade. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 3, p. 269-270, 2012.

ASHRAFIAN, H.; BUETER, M.; AHMED, K.; SULIMAN, A.; BLOOM, S.R.; DARZI, A.; ATHANASIOU, T. Metabolic surgery: an evolution through bariatric animal models. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 12, p. 907-920, 2010.

AUNE, D.; SEN, A.; PRASAD, M.; NORAT, T.; JANSZKY, I.; TONSTAD, S.; ROMUNDSTAD, P.; VATTEN, L.J. BMI and all cause mortality: systematic

review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 353, n. 2156, p. 1-17, 2016.

BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. **Acta Physiologica**, v. 19, n. 4, p. 477-487, 2010.

BALDWIN, K.M.; JOANISSE, D.R.; HADDAD, F.; GOLDSMITH, R.L.; GALLAGHER, D.; PAVLOVICH, K.H.; SHAMOON, E.L.; LEIBEL, R.L.; ROSENBAUM, M. Effects of weight loss and leptin on skeletal muscle in human subjects. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative, and Comparative, Physiology**, v. 301, n. 5, p. 1259-1266, 2011.

BARKER, D.J.P. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatrica**, v. 93, n. 446, p. 26-22, 2004.

BAYOL, S.; SIMBI, B.H.; STICKLAND, N.C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **Journal Physiology**, v. 567, n. 3, p. 951-961, 2005.

BEAULAC, J.; SANDRE, D. Critical review of bariatric surgery, medically supervised diets, and behavioral interventions for weight management in adults. **Perspectives in Public Health**, v. 20, n. 11, p. 1-11, 2016.

BENTON, M.J.; WHYTE, M.D.; DYAL, B. . Sarcopenic obesity: strategies for management. **American Journal of Nursing**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

BERNARDES, F.B.; LEITE, V.F.; LIBERALI, R.; NAVARRO, F. Relação da obesidade com diabetes mellitus tipo 2 com ênfase em nutrição e atividade física. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 3, n. 15, p. 241-250, 2009.

BIOLO, G.; CEDERHLOM, T.; MUSCARITOLI, M. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 5, p. 737-748, 2014.

BLOCH-GALLEGO, E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. **Cellular and Molecular Life Science**, v.72, n.6, p. 1029-1046, 2015.

BORDALO, L.A.; MOURÃO, D.M.; BRESSAN, J. Deficiências nutricionais após cirurgia bariátrica. Por que ocorrem? **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 1021-1028, 2011.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C.; LIMA, B.; KUNZ, R.I.; CAVÉQUIA, M.C. Tecido muscular, 2016. Disponível em: <<http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/>> Acesso em: 24 de julho 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Ciclos de vida, Brasil e Grandes Regiões**. 90 p., 2015. Disponível em: <<http://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 18, n. 9, p. 670-672, 1970.

CAMPBELL, L.E.; LANGLAI, P.R.; DAY, S.E.; COLETTA, R.L.; BENJAMIN, T.R.; FILIPPIS, E.A.; MADURA, J.A.; MANDARINO, L.J.; ROUST, L.R.; COLETTA, D.K. Identification of novel changes in human skeletal muscle proteome following Roux-en-Y gastric bypass surgery. **Diabetes**, v.65, n. 8, p. 831-841, 2016.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult. **Journal of Clinical Nursing**, v. 24, n. 23, p. 3716-3729, 2015.

DAL PAI-SILVA, M.; CAVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36 (suplemento especial), p. 21-31, 2007.

DE LORENZO, A.; SOLDATI, L.; SARLO, F.; CALVANI, M.; DI LORENZO, N.; DI RENZO, L. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 681-703, 2016.

DEJÁRDIN, D.D.C.; PEREFERRER, S.F.; GONZÁLES, M.H.; BLASCO, S.B.; SALLA, M.A. The evolution of experimental surgery in the field of morbid obesity. **Obesity Surgery**, 14, n. 9, p. 1263-1272, 2004.

DENIES, M.S.; JOHNSON, J.; MALIPHOL, A.B.; BRUNO, M.; KIM, A.; RIZVI, A.; RUSTICI, K.; MEDLER, S. Diet-induced obesity alters skeletal muscle fiber types of male but not female mice. **Physiological Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

DESAI, M.; JELLYMAN, J.K.; ROSS, M.G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 39, n.4, p. 633-641, 2015.

DIEMEN, V.V.; TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.

DIJK, S.J.V.; MOLLOY, P.L.; VARINLI, H.; MORRISON, J.L.; MUHLHAUSLER, B.S. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 85-97, 2015.

DU, M.; YAN, X.; TONG, J.F.; ZHAO, J.; ZHU, M.J. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 4-12, 2010.

EBERLE, C.; AMENT, C. Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. **INRS Pediatrics**, v. 2012, p.1-11, 2012.

EL-KHANI, U.; AHMED, A.; HAKKY, S.; NEHME, J.; COUSINS, J.; CHAHAL, H.; PURKAYASTHA, S. The Impact of obesity surgery on musculoskeletal disease. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 12, p. 2175-2192, 2014.

FAGERLUND, M.J.; ERIKSSON, L.I. Current concepts in neuromuscular transmission. **British Journal of Anaesthesia**, v. 103, n. 1, p. 108-114, 2009.

FINUCANE, M.M.; STEVENS, G.A.; COWAN, M.; DANAEI, G.; LIN, J.K.; PACIOREK, C.J.; SINGH, G. M.; GUTIERREZ, H. R.; LU, Y.; BAHALIM; A.N., FARZADFAR, F.; RILEY, L. M.; EZZATI, M. National, regional, and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health

examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **The Lancet**, v. 12, n. 377, p. 557-567, 2011.

FRONTERA, W.R; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A brief review of structure and function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015.

GILLIES, A.R.; LIEBER, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, 2011.

GRAYSON, B.E.; SCHNEIDER, K.M.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J. Improved rodent maternal metabolism but reduced intrauterine growth after vertical sleeve gastrectomy. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 199, p. 119ra112, 2013.

GUDSNUK, K.M.A.; CHAMPAGNE, F.A. Epigenetic Effects of Early Developmental Experiences. **Clinical Perinatology**, v. 38, p. 703-717, 2011.

HALL, K.E.; BRANDS, M.W.; DIXON, W.N.; SMITH, M.J. Obesity-induced hypertension, renal function and systemic hemodynamics. **Hypertension**, v. 22, n. 3, p. 292-299, 1993.

HICKEY, M.S.; CAREY, J.O.; AZEVEDO, J.L.; HOUMARD, J.A.; PORIES, W.J.; ISRAEL, R.G.; DOHM, G.L. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 3, 453-457, 1995.

HIGA, T.S.; SPINOLA, A.V.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; EVANGELISTA, F.S. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.

JALALI, M.S.; SHARAFI-AVARZMAN, Z.; RAHMANDAD, H.; AMMERMAN, A.S. Social influence in childhood obesity interventions: A systematic review. **Pediatric Obesity**, v. 17, n. 9, p. 820-832, 2016.

JALILVAND, A.; SUZO, A.; HORNOR, M.; LAYTON, K.; ABDEL-RASOUL, M.; MACADAM, L.; MIKAMI, B.; NEEDLEMAN, B.; NORIA, S. Impact of care coaching on hospital length of stay, readmission rates, postdischarge phone calls, and patient satisfaction after bariatric surgery. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1737-1745, 2016.

JOSEFSSON, A.; BLADH, M.; WIREHN, A.B.; SYDSJO, G. Risk for congenital malformations in offspring of women who have undergone bariatric surgery. A national cohort. **An international Journal of Obstetric and Gynaecology**, v. 120, n. 12, p. 1477-1482, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 178p.

KARRA, E.; YOUSSEIF, A.; BATTERHAM, R.L. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 337-344, 2010.

KELLEY, D.E.; GOODPASTER, B.H. Skeletal muscle triglycerides an aspect of regional adiposity and insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 24, n. 5, p. 933-941, 2001.

KEMP, J.G.; BLAZEVI, R.; STEPHENSON D.G.; STEPHENSON G.M.M. Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 8, p. 831-841, 2009.

LAGER, J.C.; ESFANDIARI, N.H.; SUBAUSTE, A.R.; KRAFTSON, A.T.; BROWN, M.B.; CASSIDY, R.B.; NAY, C.K.; LOCKWOOD, A.L.; VARBAN, O.A.; ORAL, E.A. Roux-En-Y gastric bypass vs. sleeve gastrectomy: Balancing the risks of surgery with the benefits of weight loss. **Obesity Surgery**, v. 27, n. 1, p. 154-161, 2016.

LE, N.H.; KIM, C.S.; PARK, T.; PARK, J.H.Y.; SUNG, M.K.; LEE, D.G.; HONG, S.M.; CHOE, S.Y.; GOTO, T.; KAWADA, T.; YU, R. Quercetin protects against obesity-induced skeletal muscle inflammation and atrophy. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 10, 2014.

LEE, S.R.; KHAMOUI, A.V.; JO, E.; PARK, B.S.; ZOURDOS, M.C.; PANTON, L.B.; ORMSBEE, M.J.; KIM, J.S.; Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 4, p. 403-411, 2015.

LIND, L.; LIND, M.P.; LEJONKLOU, M.H.; DUNDER, L.; BERGMAN, A.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; LAMPA, E.; LEE, H.K.; LEGLER J.; NADAL, A.;

PAK, Y.K.; PHIPPS, R.P.; VANDEBERG, L.N.; ZALKO, D.; ARGESTRAND M.; ÖBERG, M.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J.J.; BIRBAUM, L.S. Uppsala Consensus Statement on Environmental Contaminants and the Global Obesity Epidemic. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 5, p. 81-83, 2016.

MACMILLEN, I. C.; ROBINSON, J.S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 2, p. 571-633, 2005.

MARIEB, E.N.; HOEHN, K. **Anatomia e Fisiologia**. 3 ed. Artmed, 2009. 1072 p.

MARTINEZ-HUENCHULLAN, S.; MCLENNAN, S.V.; VERHOEVEN, A.; TWIGG, S.M.; TAM, C.S. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. **Obesity Review**, v. 18, n. 7, p. 776-790, 2017.

MARTIRE, S.I.; HOLMES, N.; WESTBROOK, R.F.; MORRIS, M.J. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: Increased snacking and its implications for development of obesity. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

MILAGRO, F.I.; MANSEGO, M.L.; MIGUEL, C. D.; MARTÍNEZ, J.A.; Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34; p. 782-812, 2013.

MONSON, M.; JACKSON, M. Pregnancy After Bariatric Surgery. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 1, p. 158-171, 2016.

MOSINSKI, J.D.; KIRWAN, J.P. Longer-term physiological and metabolic effects of gastric bypass surgery. **Current Diabetic Report**, v. 16, n. 50, p. 3-9, 2016.

NAGARAJAN, P.; KUMAR, M.J.M; VENKATESAN, R.; MAJUNDAR, S.S.; JUYAL, R.C. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 11, p. 1141-1153, 2012.

NASCIMENTO, A.F.; SIGIZAK, M.M.; LEOPOLDO, A.S.; LUVIZOTTO, R.A. M.; NOGUEIRA, C.R.; CICOGNA, A.C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.

NG, M.; LIU, P.; THOMSON, B.; MURRAY, C.J.L. A novel method for estimating distributions of body mass index. **Population Health Metrics**, v. 14, n. 6, p. 1-7, 2016.

OLIVEIRA, R.A.R.; JUNIOR, R.J.M.; TAVARES, D.D.F.; MOREIRA, O.C.; LIMA, L.M.; AMORIM, P.R.S.; BRITTO, R.R.; MARINS, J.C.B. Prevalence of obesity and association of body mass index with risk factors in public school teachers. **Revista Brasileira de cineantropometria e desempenho humano**, v. 17, n. 6, p. 742-752, 2015.

PARLEE, S.D.; MACDOUGLAD, O.A. Maternal Nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 495-506, 2014.

PATTI, M.E. Reducing maternal weight improves offspring metabolism and alters (or modulates) methylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. 12859-12860, 2013.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012.

PELLEGRINELLI, V.; ROUAULT, C.; ALBERT, V.; EDOM-VOVARD, F.; VIDAL-PUIG, A.; CLÉMENT, K.; BUTLER-BROWNE, G.; LACASA, D. Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3121-3134, 2015.

PEREIRA, P.F.; SERRANO, H.M.S.; CARVALHO, G.Q.; RIBEIRO, S.M.R.; PELUZIO, M.C.G.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, S.E. Measurements of body fat distribution: assessment of collinearity with body mass, adiposity and height in female adolescents. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 1, p. 63-71, 2015.

PIMENTA, F.B.C.; BERTRAND, E.; MOGRABI, D.C.; SHINOHARA, H.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. The relationship between obesity and quality of life in Brazilian adults. **Frontiers in Psychology**, v. 6, n. 966, p. 1-7, 2015.

RAO, R.S.; RAO, V.; KINI, S. Animal models in bariatric surgery--a review of the surgical techniques and postsurgical physiology. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 9, p. 1293-1305, 2010.

RIBEIRO, A.M.; LIMA, M.C.; LIRA, P.I.C.; SILVA, G.A.P. Baixo peso ao nascer e obesidade: Associação causal ou casual?. **Revista Paulista de pediatria**, v. 33, n. 3, p. 340-348, 2015.

RISSI, R.; LEMOS, G.A.; IDE, B.N.; CAMARGO, R.L.; BRANCO, R.C.S.; MORATO, P.N.; PALOMARI, E.T. Joint immobilization: effects on muscular tissue of obese and malnourished mice. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2016.

ROSSINI, T.C.; SILVA, A.S.R.; MORAES, C. Diet-induced obesity: Rodent model for the study of obesity-related disorders. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAMPEY, B.P.; VANHOOSE, A.M.; WINFIELD, H.M.; FREEMERMAN, A.J.; MUEHLBAUER, M.J.; FUEGER, P.T.; NEWGARD, C.B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, 2011.

SILVENNOINEN, M.; RINNANKOSKI-TUIKKA, R.; VUENTO, M.; HULMI, J.J.; TORVINEN, S.; LEHTI, M.; KIVELÄ, R.; KAINULAINEN, H. High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries. **Angiogenesis**, v. 16, n. 2, p. 297-307, 2013.

SISHI, B.; LOOS, B.; ELLIS, B.; SMITH, W.; TOIT, E.F. ENGELBRECHT, A.M. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 2, p. 179-193, 2010.

SPANIOLAS, K.; PORIES, W.J. Surgery for type 2 diabetes: The case for Roux-en-Y gastric bypass. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1220-1224, 2016.

TANNER, C.J.; BARATAKI, H.A.; DOHM, L.; PORIES, W.J.; MACDONALD, K.G.; GUNNINGHAM, P.R.G.; SWANSON M.S.; HOUMARD, J.A. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 282, n. 6, p. 1191-1196, 2002.

ULSENHEIMER, B.H.; CONFORTIM, H.D.; JERONIMO, L.C.; CENTENARO, L.A.; GUIMARÃES, A.T.B.; BONFLEUR, M.L.; BALBO, S.L.; MATHEUS, S.M.M.; TORREJAIS, M.M. Effects of duodenal-jejunal bypass on structure of diaphragm in western diet obese rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 1-13, 2017.

ZHENG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Q.; YU, M.; XU, J.; WANG, Z. Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 14968-14983, 2014.

WADE, A.J.; MARBUT, M.M.; ROUND, J.M. Muscle fibre type and aetiology of obesity. **Lancet**, v. 335, n. 8693, p. 805-808, 1990.

WARD, S.S.; STICKLAND, N.C. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition?. **Muscle Nerve**, v. 14, n.3, p. 259-267, 1991.

WHO. World Health Organization. **Global Status Report on Noncommunicable diseases 2014**. 302 p. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WOO, J.H.; SHIN, K.O.; LEE, Y.H.; JANG, K.S.; BAE, J.Y.; ROH, H.T. Effects of treadmill exercise on skeletal muscle mTOR signaling pathway in high-fat diet-induced obese mice. **The Journal of Physical Therapy Science**, v. 28, n. 4, p. 1260-1265, 2016.

ARTIGO CIENTÍFICO 1
SUBMETIDO À RESVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF
DEVELOPMENT RESEARCH (ANEXO B)

Morphological changes of the extensor digitorum longus
muscle in the offspring of obese rats

**MORPHOLOGICAL CHANGES OF EXTENSOR DIGITORUM LONGUS
MUSCLE IN THE OFFSPRING OF OBESE RATS**

**Camila Kuhn^{1*}, Pâmela Buratti¹, Rose Meire Costa Brancalhão¹, Sandra
Lucinei Balbo¹, Marcia Miranda Torrejais¹**

¹ Programa de Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brazil.

***Corresponding author:**

Camila Kuhn

Fone: +55 45 99999-6131 / +55 45 3220.3132

E-mail: camilaquiro@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers and neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus muscle (EDL) in the offspring of obese rats induced by a cafeteria diet. **Methods:** Three-week-old female Wistar rats were randomly divided into two groups: a control (CTL) group that received a standard diet and an obese (OB) group that received a cafeteria diet. The animals were mated at 23 weeks of age. After birth, only males were used for the experiment. The offspring of the first generation (F1) were designated CTL-F1 and OB-F1 according to the treatment of the mothers and received the standard diet. The animals were euthanized at 17 weeks of age and the EDL muscle was collected and routinely processed for morphological and morphometric analysis by light microscopy and transmission electron microscopy. **Results:** The body weight, retroperitoneal and periepididymal fat weight and capillary/fiber ratio were higher in the OB-F1 group compared to CTL-F1. However, a reduction in the number of nuclei, connective tissue, ultrastructural parameters, and NMJ area and largest diameter was observed in the OB-F1 group. **Conclusion:** Feeding mothers an obesogenic diet throughout life induces morphological and morphometric changes in the skeletal muscle fibers and NMJs of their offspring in later life.

Keywords: Obesity, Skeletal Muscle Fibers, Neuromuscular Junction, Microscopy, Fetal Development

INTRODUCTION

Obesity is a multifactorial disease that has reached epidemic proportions in Brazil and in the world (DE LORENZO, 2016; IBGE, 2010). In addition to a sedentary lifestyle and the habit of consuming hypercaloric diets, a new concept has emerged that helps understand the obesity epidemic. This concept, known as “Developmental origins of health and disease” (DOHad), postulates that insults during fetal life can lead to the development of diseases in adult life (HEINDEL and VANDENBERG, 2015). According to this concept, a hypercaloric maternal diet during pregnancy and lactation increases the risk of offspring developing obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus through metabolic programming (BARKER, 2004).

Skeletal muscle tissue is the most abundant tissue in the body that has important physical and metabolic functions (LE et al., 2014). The morphofunctional properties of skeletal muscle are determined during embryogenesis and the fetal period is therefore crucial to its development. Maternal obesity has been shown to compromise fetal muscle development by affecting the differentiation of mesenchymal cells (DU et al., 2010). However, there are no data in the literature on the effects of maternal obesity on skeletal muscle fiber morphology in the offspring. The objective of the present study was to evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers and neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus (EDL) muscle in the offspring of obese rats induced by a cafeteria diet.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism, Sectorial Animal House, Center for Biological and Health Sciences, and at the Experimental Laboratory of Morphology, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel Campus, in collaboration with the Center for Electron Microscopy, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu Campus. All adopted procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Universidade Estadual do Oeste do Paraná, and were conducted in accordance with animal research guidelines.

Experimental procedure – dams

First, 27 female Wistar rats at 3 weeks of age were randomly divided into two groups. The control group (CTL; n = 13) received standard rat chow (3.8 kcal/g: 70% carbohydrate, 20% protein, and 10% fat) (BioBase, Brazil) and water *ad libitum*. The obese group (OB; n = 14) received, in addition to the standard diet, a cafeteria diet (5.4 kcal/g: 38.5% carbohydrate, 15% protein, and 46.5% fat) (Goularte et al., 2012), with some modifications (Table 1), and 350 ml/day degassed Coca-Cola (Coca-Cola, Brazil) or Guaraná. The animals were maintained at a room temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ under a 12h photoperiod. After 20 weeks of feeding the diets, the dams of the two groups were mated at a ratio of two females per male.

Experimental procedure – offspring

Animals

Six pups per litter were maintained at birth. After 30 days, the offspring were separated from the dams and only males were used for the experiments. The offspring of the first generation (F1) were designated CTL-F1 (n = 7) and OB-F1 (n = 7) according to the treatment of the mothers. All animals received the standard diet from weaning until euthanasia.

Evaluation of weight and obesity and collection of extensor digitorum longus muscle

The animals were euthanized at 17 weeks of age. The body weight and retroperitoneal and periepididymal fat weight were used for the evaluation of obesity.

For collection of EDL muscle, the skin of the hind limb was separated and the tibialis anterior muscle was removed for dissection of the EDL. The length (mm) of the muscle was measured with a digital caliper (Digimess®, São Paulo, Brazil) and the muscle was weighed. The muscle was then cut into fragments with a stainless-steel blade for subsequent histological study, histoenzymological analysis of muscle fibers, and histochemical study of NMJs.

Study of muscle fibers

For the study of muscle fibers, the distal fragments of the right antimer of the EDL muscle were removed and kept for 30-40 min at room temperature (KHAN, 1977). For tissue preservation, the material was covered with neutral talc

(MOLINE et al., 1964), frozen in liquid nitrogen for 2 min, and stored in a biofreezer at -80°C. The frozen muscle fragments were transferred to a cryostat chamber (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome) at -30°C and kept for 30 min. Next, one end of the fragments was fixed to a metal support with Jung Tissue Freezing Medium (Leica, Germany) and cut transversely at intervals of 7 µm. The sections obtained were submitted to specific staining methods and reactions for muscle fiber analysis as described below.

Histological study

Cross-sections of the EDL muscle were stained with hematoxylin-eosin (HE) according to the technique of Junqueira et al. (1983) to determine the number of nuclei, number and area of muscle fibers, number of capillaries, and the capillary/fiber ratio. Ten microscopic fields (40X objective) were analyzed per animal. For nucleus count, fiber count and fiber area, only intact fibers in the microscopic fields were considered. For capillary count and capillary/fiber ratio, muscle fibers covering the upper and right margins were included in the count, while those present at the lower and left margins were excluded from the analysis. The counts were performed individually by two trained evaluators and the mean of the values obtained was used for analysis (FERNANDES et al., 2012).

Histoenzymological and morphometric study

The oxidative and glycolytic metabolism of muscle fibers was evaluated by the nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-TR) reaction as described by Pearse (1972) and modified by Dubowitz et al. (1973).

For morphometry, the cross-sectional area of the EDL muscle obtained from the histoenzymological study was measured and the different muscle fiber types (I, IIa, and IIb) were quantified. Two microscopic fields per animal were randomly chosen (20X objective).

Study of connective tissue

For connective tissue analysis, the proximal fragments of the right antimeric of the EDL muscle were fixed in buffered formalin and stored in 70% alcohol for subsequent histological processing consisting of dehydration in an increasing alcohol series, clearance in xylene, and embedding in paraplast. The embedded muscles were cut with a microtome into 7- μ m sections and stained with Masson's trichrome for the measurement of connective tissue percentage (endomysium and perimysium). This percentage was calculated by the number of pixels (BOSI et al., 2008) in 10 random microscopic fields per animal (40X objective).

Ultrastructural study of muscle fibers

For ultrastructural analysis of muscle fibers, distal fragments of the left antimeric of the EDL muscle were removed and fixed in Karnovsky solution (KARNOVSKY, 1965). The material was cut into longitudinal sections of approximately 1 mm, washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3 (15 min), and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer (2 h). Next, the sections were washed in distilled water (3 times for 5 min), incubated with 0.5% uranyl acetate in aqueous solution (2h), dehydrated in an increasing acetone series, and

immersed in a mixture of resin and 100% acetone (12 h) for subsequent resin embedding. The desired fields were selected in semi-thin sections (0.5 μm) and ultrathin sections (90 nm) were cut with an ultramicrotome (Ultracut UCT, Leica®, Germany). The ultrathin sections were stained with a saturated solution of uranyl acetate (20 min) and lead citrate (10 min) for subsequent analysis.

Histochemical and morphometric study of neuromuscular junctions

For morphological and morphometric analysis of NMJs, proximal fragments of the left antimeres of the EDL muscle were removed, immersed in Karnovsky solution (KARNOVSKY, 1965) at room temperature, and cut longitudinally into three or four pieces with a stainless-steel blade. The sections obtained were submitted to the nonspecific esterase reaction (LEHRER; ORNSTEIN, 1959).

For morphometric analysis, the area and largest and smallest diameters of 100 NMJs per animal were measured on the microscopic images (20X objective).

Image analysis

The morphological and morphometric analyses of muscle fibers and NMJs were performed on images captured with an Olympus Bx60® microscope coupled to an Olympus DP71 camera (Tokyo, Japan) using the DP Controller 3.2.1 276 program. For ultrastructural analysis, the material obtained was examined and photographed under a transmission electron microscope (CM100, Philips®, The

Netherlands). The Image Pro Plus 6.0[®] program (Media Cybernetics, Maryland, USA) was used for the analyses.

Statistical analysis

The ultrastructural data were analyzed descriptively. The remaining data were submitted to statistical analysis using the GraphPad Prism[®] program (La Jolla, USA), considering the results of the Kolmogorov-Smirnov test for normality. Normally distributed data were compared by the Student *t*-test, while data following a non-normal distribution were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney test. A *p* value $p \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Macroscopic parameters

As can be seen in Table 2, animals of the OB-F1 group exhibited an increase of 10% in body weight ($p = 0.05$), of 88% in retroperitoneal fat ($p < 0.0$), of 43% in periepididymal fat ($p = 0.016$), and of 3% in the Lee index ($p = 0.035$) compared to the CTL-F1 group. There was no significant difference in naso-anal length ($p = 1.0$), EDL muscle weight ($p = 0.278$), or EDL muscle length ($p = 0.256$) between the groups studied (Table 2).

Morphology and morphometry of muscle fibers and collagen

The general architecture of muscle fibers of the EDL muscle was preserved in the groups studied (CTL-F1 and OB-F1), with the observation of multinucleated polygonal fibers with peripheral nuclei organized in fascicles and

capillaries intermingled with endomysial and perimysial connective tissue (Figure 1A and 1B).

Morphometry of HE-stained muscle fibers revealed no significant differences in the area ($p = 0.972$) or number of fibers ($p = 0.152$) between the groups studied. However, there were 19% fewer nuclei in the OB-F1 group compared to CTL-F1 ($p = 0.03$), but no significant difference was found in the nucleus/fiber ratio ($p = 0.605$). Regarding capillary, no difference was observed in the number of capillaries ($p = 0.871$), but the capillary/fiber ratio was increased by 15% in the OB-F1 group when compared to CTL-F1 ($p = 0.004$) (Table 3).

Connective tissue was analyzed by staining with Masson's trichrome (Figure 1C and 1D). Analysis of its percentage revealed a 32% reduction in the OB-F1 group compared to CTL-F1 ($p = 0.0002$) (Table 3).

The muscle fibers were classified as proposed by Brooke and Kaiser (1970) into type I, IIa and IIb fibers. The NADH-TR reaction evidenced type I fibers (smaller diameter and intense oxidative activity), type IIa fiber (intermediate diameter and intermediate oxidative activity), and type IIb fibers (larger diameter and weak oxidative activity) in the two groups (Figure 2A and 2B). No significant differences in the area or number of the different fiber types were found between the groups studied (Figure 2C and 2D).

Ultrastructural analysis

Ultrastructural assessment by transmission electron microscopy showed a well-defined morphology. The muscle fibers were organized in sarcomeres following the striated pattern of light and dark bands (I-band and A-band,

respectively) in the CTL-F1 and OB-F1 groups (Figure 3A and 3B). Increased myofibrillar disorganization and increased disorganization and dissolution of the Z-line were observed in the OB-F1 group (Figure 3B).

Analysis of neuromuscular junctions

The NMJs of the groups studied were polymorphic and had a round, oval and elliptical shape (Figure 4A and 4B). Morphometric analysis showed a reduction of 17% in NMJ area ($p < 0.001$) and of 12% in the largest diameter ($p < 0.001$) in the OB-F1 group when compared to CTL-F1. The smallest diameter was similar in the two groups ($p = 0.118$) (Figure 4C, 4D, and 4E).

DISCUSSION

Pregnancy is a physiological state characterized by a complex anatomical and functional interaction between the mother and fetus (LEIVA et al., 2011). Human and animal studies have shown that exposure to disturbances during this period can affect fetal development, resulting in metabolic abnormalities (DESAI et al., 2015; SHARPLES et al., 2016). This concept, known as metabolic programming, is associated with epigenetic alterations (DESAI et al., 2015). However, the underlying mechanisms are still unclear.

In the present study, an increase in the Lee index, body weight and retroperitoneal and periepididymal fat weight was observed in OB-F1 animals when compared to the CTL-F1 group. Studies have shown that maternal obesity during pregnancy causes excess weight in animals (ZHENG et al., 2014) and children (PIRKOLA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2015). These findings might be

related to placental and endothelial alterations (PARLEE and MACDOUGLAD, 2014). The placenta of obese mothers contains inflammatory markers that promote vasodilation and overproduction of nitric oxide in the endothelium, increasing its permeability. This placental dysfunction is the key mechanism in the future development of metabolic syndrome (LEIVA et al., 2011).

Skeletal muscle has the ability to remodel itself and adapt in response to functional demands and diseases such as obesity (KEMP et al., 2009). Adult rats receiving a hypercaloric diet exhibit a reduction in muscle weight and in muscle fiber cross-sectional area (LE et al., 2014; LEE et al., 2015). However, studies on offspring are still sparse and the present investigation is the first to evaluate the effects of maternal obesity on the morphology and morphometry of muscle fibers and NMJs in adult offspring.

Bayol et al. (2005) demonstrated a reduction in the number of muscle fibers and cross-sectional fiber area in offspring born to obese mothers. In the present study, the area and number of muscle fibers were similar in the two groups, but a reduction in the number of nuclei was observed in the OB-F1 group. The number of nuclei is related to cell volume and is responsible for a specific but not fixed amount of sarcoplasm. A reduction in cell volume requires less protein and myofibrils respond by eliminating their nuclei (TEIXEIRA and DUARTE, 2001). Although no difference in muscle fiber area was observed, it may have recovered its volume until adult age.

One of the determinant factors of muscle fiber integrity is capillarity. In the present study, the capillary/fiber ratio was increased by 13% in the OB-F1 group. This increase is related to a greater supply of oxygen to the muscle fiber, which

is important for maintaining the metabolic activities of the muscle (DEGENS and ALWAYS, 2006). Hypercaloric diets require greater oxygen supply and the increase in capillarity is probably an adaptation to insufficient oxygen transport (SILVENNOINEN et al., 2013).

Structural support and protection of muscle tissue are the functions of the extracellular matrix, which is mediated by connective tissue (CARMELI et al., 2004). A reduction in the percentage of connective tissue was observed in EDL muscle of OB-F1 animals. This finding might be associated with an increase in matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-2 and MMP-9, enzymes involved in the degradation of collagen (CHEN and LI, 2009). MMPs have been found to be increased in inflammatory processes (CARMELI et al., 2009) and it has been shown that maternal obesity is associated with inflammatory responses in the offspring (TONG et al., 2009).

Obesity also interferes with the different muscle fiber types, with the observation of a smaller number of type I fibers and a predominance of type II fibers in obese individuals. Fibers type II participate in the storage of lipids in skeletal muscle (TANNER et al., 2002). There are no reports in the literature investigating the effects on different fiber types in the offspring. Thus, this is the first study demonstrating a similar area and similar number of the different fiber types in rat offspring born to obese and control dams. Moreover, myofibrillar disorganization and Z-line disorganization and dissolution were observed in the OB-F1 group. These findings might be explained by the protein deficit of the cafeteria diet administered during pregnancy and lactation, which may compromise normal myofibrillar arrangement (JERONIMO et al., 2016).

Myofibrillar disorganization, Z-line disorganization and lipid accumulation were also found in the diaphragm of obese rats (ULSENHEIMER et al., 2017).

Obesity is characterized by chronic inflammation and elevated levels of inflammatory markers such as interleukin 6 (IL-6). Excessive expression of this marker is implicated in the negative regulation of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (MAGGIO et al., 2013). IGF-1 plays an important role in the growth and differentiation of skeletal muscle, as well as in the neuromuscular system (CARONI, 1993). In the present study, the area and largest diameter of NMJs were reduced in the OB-F1 group. It is suggested that the increase of IL-6 may reduce IGF-1 signaling in the NMJ, consequently affecting its development.

This study demonstrated damage to skeletal muscle tissue in offspring of dams exposed to an obesogenic diet. This knowledge is important for the development of strategies to combat obesity in order to prevent its consequences in the offspring.

In conclusion, the results indicate that feeding mothers an obesogenic diet throughout life induces morphological and morphometric changes in the skeletal muscle fibers and NMJs of their offspring in later life, including a reduction in the number of nuclei, collagen and NMJ area and largest diameter, and an increase in capillary/fiber ratio. Maternal obesity also altered muscle fiber ultrastructure in the offspring. These findings highlight the importance of obesity prevention since this condition may not only affect obese individuals but also their offspring.

Acknowledgement

The UNIOESTE granted by the infrastructure, the Electronic Microscopy Center of UNESP- Botucatu.

REFERENCES

Barker DJP (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr.* 93(446):26-33.

Bayol S, Simbi BH, Stickland NC (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol.* 567(3):951-961.

Bosi PM, Delfino GB, Durigan JLQ, Cancelliero KM, Polacow MLO, Silva CA (2008). Metformina minimiza as alterações morfométricas no músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização articular. *Rev Bras Med Esporte.* 14(5):436-439.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R (2004). Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle Nerve.* 29(2):191-197.

Caroni P (1993). Activity-sensitive signaling by muscle-derived insulin-like growth factors in the developing and regenerating neuromuscular system. *Ann N Y Acad of Sciences.* 27(692):209-222.

Chen X, Li, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis (2009). *Cell Adh Migr.* 3(4):337-341.

Degens H, Always SE (2006). Control of Muscle Size During Disuse, Disease, and Aging. *Int J Sports Med.* 27(2):94-99.

De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Cavalini M, Lorenzo DN, Renzo DL (2016). New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. *World J Gastroenterol.* 22(2):681-703.

Desai M, Jellyman JK, Ross MG (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes.* 39(4):633-641.

Dubowitz V.; Brooke M (1973). *Muscle biopsy: a modern approach.* London: Saunders. 475p.

Du M, Yan X, Tong JF, Zhao J, Zhu MJ (2010). Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol Reprod.* 82(1):4-12.

Fernandes T, Roque FR, Magalhães FC, Carmo EC, Oliveira EM (2012). O treinamento físico aeróbico corrige a rarefação capilar e as alterações nas proporções dos tipos de fibra muscular esquelética em ratos espontaneamente hipertensos. *Rev Bras Med Esporte.* 18(4):267-272.

Goularte JF, Ferreira MCB, Sanvitto GL (2012). Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J of Nut.* 108(1):1511-1518.

Heindel JJ, Vandenberg LN (2015). Developmental Origins of Health and Disease: A Paradigm for Understanding Disease Etiology and Prevention. *Curr Opin Pediatr.* 27(2):248-253.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – POF. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Rio de Janeiro.

Jeronimo LC, Confortim HD, Centenaro LA, Brancalhão RMC, Pinheiro PFF, Matheus SMM, Torrejais MM (2016). Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. *Int J Morphol.* 34(1):396-403.

Junqueira LC, Junqueira LMM (1983). Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Universidade de São Paulo. 124p.

Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology.* 27(2):37-138

Kemp JG, Blazev R, Stephenson DG, Stephenson GMM (2009). Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. *Int J Obes.* 33(8):831-841.

Khan MA (1977). The histoenzymology of striated muscle fibers an overview. *Molecular Biology of the Cell*. 22:383-393.

Le NH, Kim CS, Park T, Park JHY, Sung MK, Lee DG (2014). Quercetin protects against obesity-induced skeletal muscle inflammation and atrophy. *Mediators Inflamm*. 2014(1):1-10.

Lee SR, Khamoui AV, JO E, Park BS, Zourdos MC, Panton LB (2015). Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. *Aging Clin Exp Res*. 27(4):403-411.

Leher GM, Ornstein L (1959). A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophysical and Biochemical Cytology*. 6:399-419.

Leiva A, Pardo F, Ramíres MA, Farías M, Casanello P, Sobrevia L (2011). Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. 2011:349286.

Maggio M, Vita F, Lauretani F, Butto V, Bondi G, Cattabiani C (2013). IGF-1, the Cross Road of the Nutritional, Inflammatory and Hormonal Pathways to Frailty. *Nutrients*. 5(10):4184-4205.

Moline SW, Glenner GG (1964). Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *Journal of Histochemistry e Cytochemistry*. 12:777-778.

Parlee SD, Macdouglass OA (2014). Maternal Nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochim et Biophys Acta*. 1842(1):495-506.

Pearse AGE (1972). *Histochemistry: theoretical and applied*. 3. ed. Baltimore: Williams e Wilkins. 921-961.

Pirkola J, Pouta A, Bloigu A, Hartikainen AL, Laitinen J, Järvelin MR (2010). Risks of Overweight and Abdominal Obesity at Age 16 Years Associated With Prenatal Exposures to Maternal Prepregnancy Overweight and Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 33(5):1115-1121.

Ribeiro AM, Lima MC, Lira PIC, Silva GAP (2015). Baixo peso ao nascer e obesidade: Associação causal ou casual?. *Rev Paul Pediatr*. 33(3):340-348.

Sharples AP, Stewart CE, Seaborne RA (2016). Does skeletal muscle have an 'epi'-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. *Aging Cell*. 15(4):603-616.

Silvennoinen M, Rinnankoski-Tuikka R, Vuento M, Hulmi JJ, Torvinen S, Lehti M (2013). High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries. *Angiogenesis*. 16(2):297-307.

Tanner CJ, Barataki HA, Dohm L, Pories WJ, Macdonald KG, Gunningham PRG (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282(6):1191-1196.

Teixeira CE, Duarte JA (2001). Myonuclear domain in skeletal muscle fibers. A critical review. *Arch Exerc Health Dis*. 2(2):92-101.

Tong JF; Yan X, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, DU M (2009). Maternal obesity downregulates myogenesis and β -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296(4):917-924.

Ulsenheimer BH, Confortim HD, Jeronimo LC, Centenaro LA, Guimarães ATB, Bonfleur ML, Balbo SL, Matheus SMM, Torrejais MM (2017). Effects of duodenal-jejunal bypass on structure of diaphragm in western diet obese rats. *Acta Cir Bras*. 32(1):1-13.

Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J, Wang Z (2014). Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *Int J Mol Sci*. 15(9):14968-14983.

Table 1. Nutritional composition of the ingredients of the cafeteria diet.

	Energy (kcal/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)	Protein (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Sodium (mg/100 g)
Standard chow (BioBase, Brazil) ^a	295	70	20	10	0
Salami (Sadia, Brazil) ^b	415	0.56	35	30	2.000
Bread roll (Nutrella, Brazil) ^b	332	64	6.8	6	356
Bacon-flavored snack (Troféu, Santa Helena, Brazil) ^b	496	56	7.6	16	1.036
Mixed sausage (Sadia, Brazil) ^b	320	0	18	28	1.574
Chocolate cake (Renata, Selmi, Brazil) ^b	381	55	4.1	16.2	173.3
Corn snack (Cheetos, Pepsico, Brazil) ^b	125	17	1.6	5.6	99
Mortadella (Frimesa, Brazil) ^b	317	9.5	13.2	16	2.112.5
Marshmallow (Fini, Brazil) ^b	330	80	5	0	47.5
Corn flour biscuits (Zadimel, Brazil) ^b	440	80	11	5	333
Chocolate wafers (Bauduco, Brazil) ^b	523	63	5	27	177

^a Data provided by the manufacturer. ^b Data obtained from the packaging.

Table 2. Macroscopic parameters of rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1) at 17 weeks of age.

Parameter	CTL-F1 (n = 7)	OB-F1 (n = 7)
Body weight (g) ^a	382.1 ± 24.71	420.0 ± 40.11*
EDL muscle weight (g) ^a	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01
EDL muscle length (mm) ^a	26.15 ± 3.30	24.45 ± 1.87
Retroperitoneal fat (g) ^a	2.29 ± 0.83	4.31 ± 0.82**
Periepididymal fat (g) ^a	3.51 ± 0.67	5.01 ± 1.24*
Naso-anal length (cm) ^b	22.93 ± 0.53	23.0 ± 0.28
Lee index ^a	315.7 ± 8.11	325.9 ± 7.92*

Values are expressed as the mean ± standard deviation. ^aStudent *t*-test. ^bMann-Whitney test.

* $p \leq 0.05$; ** $p < 0.001$.

Table 3. Microscopic parameters of the EDL muscle of rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1) at 17 weeks of age.

Parameter	CTL-F1 (n = 7)	OB-F1 (n = 7)
Fiber area (μm^2)	1.37 \pm 232.0	1.38. \pm 295.7
Number of fibers	149.9 \pm 33.71	125.9 \pm 24.35
Number of nuclei	229.9 \pm 41.36	185.3 \pm 24.86*
Nucleus/fiber ratio	1.54 \pm 0.19	1.49 \pm 0.20
Number of capillaries	294.9 \pm 35.59	291.7 \pm 35.68
Capillary/fiber ratio	1.23 \pm 0.09	1.42 \pm 0.09**
% Connective tissue	6.73 \pm 0.87	4.57 \pm 0.68***

Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Student *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$;

*** $p < 0.0005$.

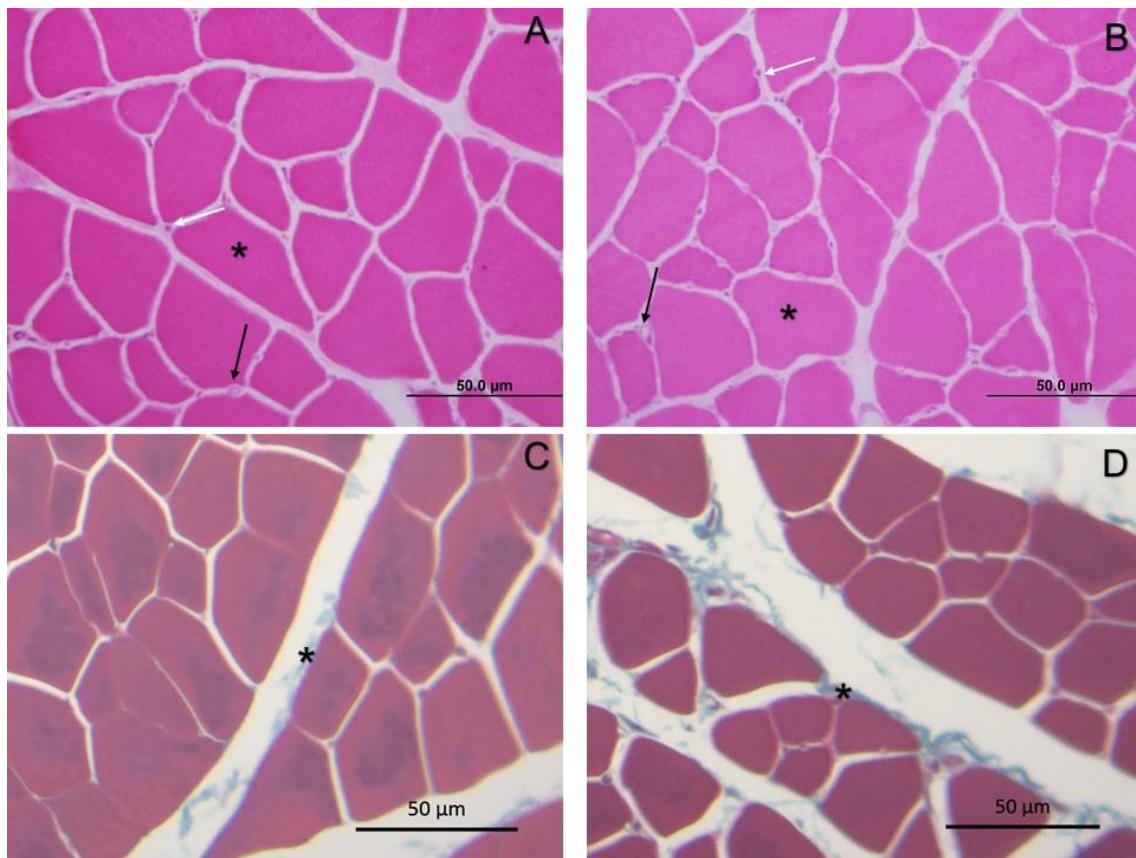
Figures**Figure 1.**

Figure 2.

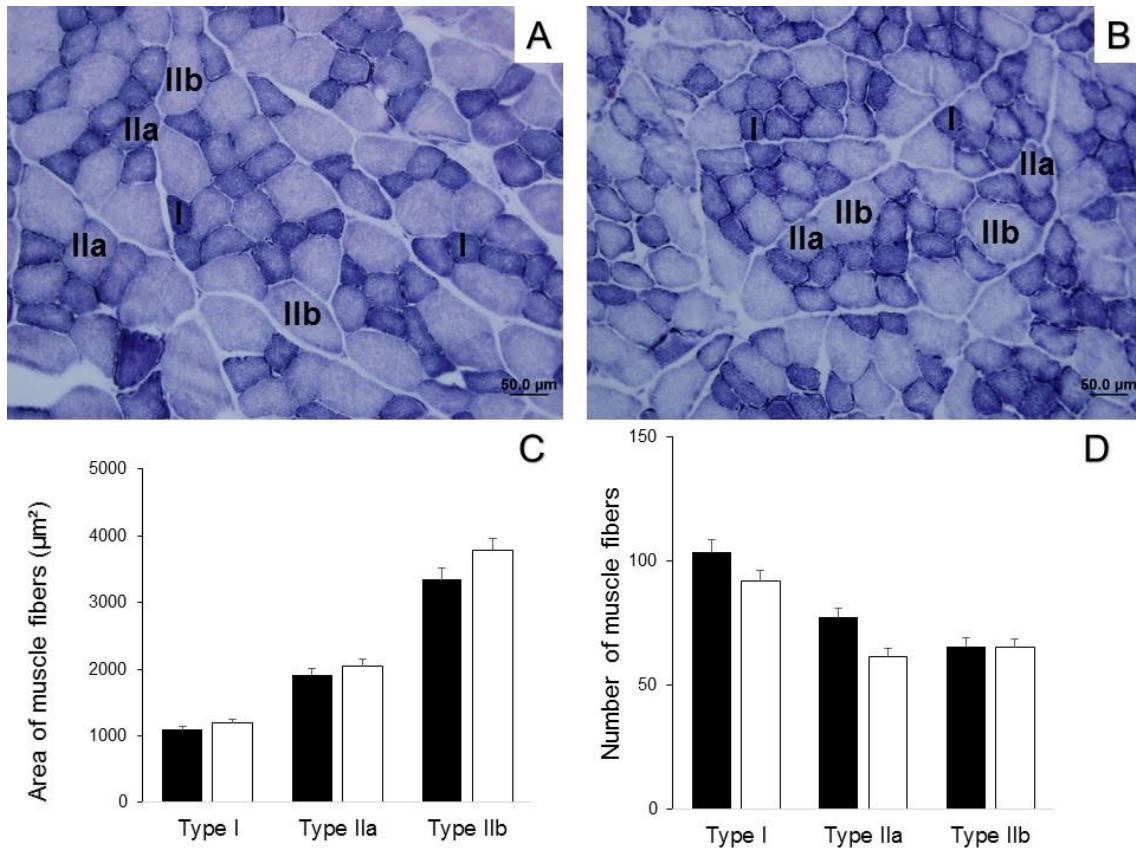


Figure 3.

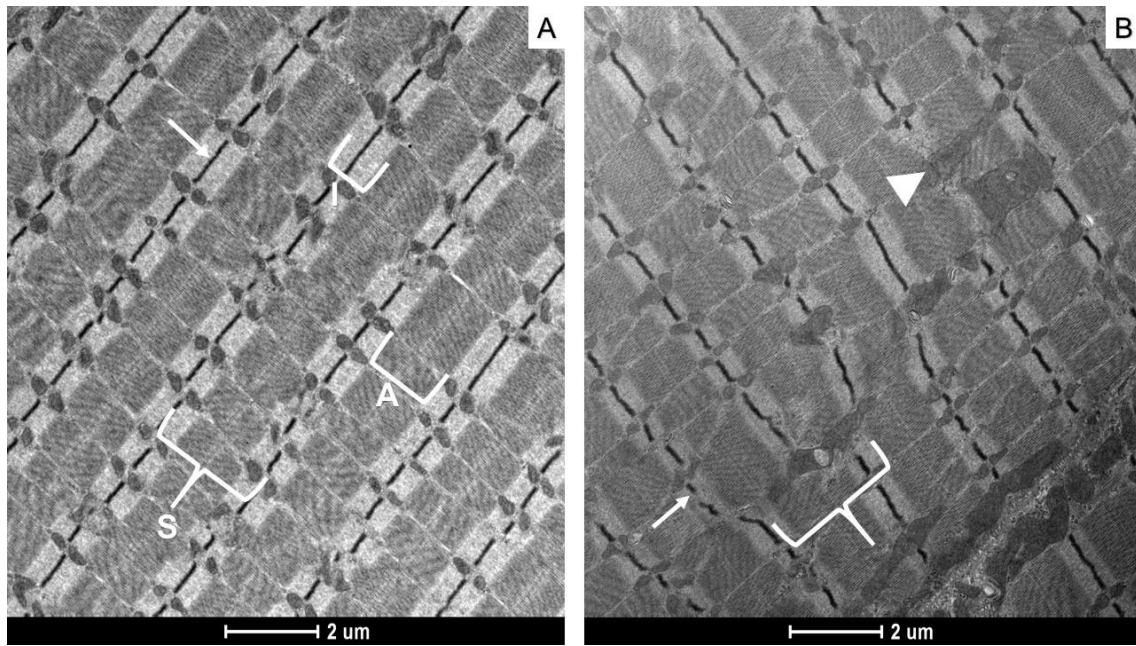


Figure 4.

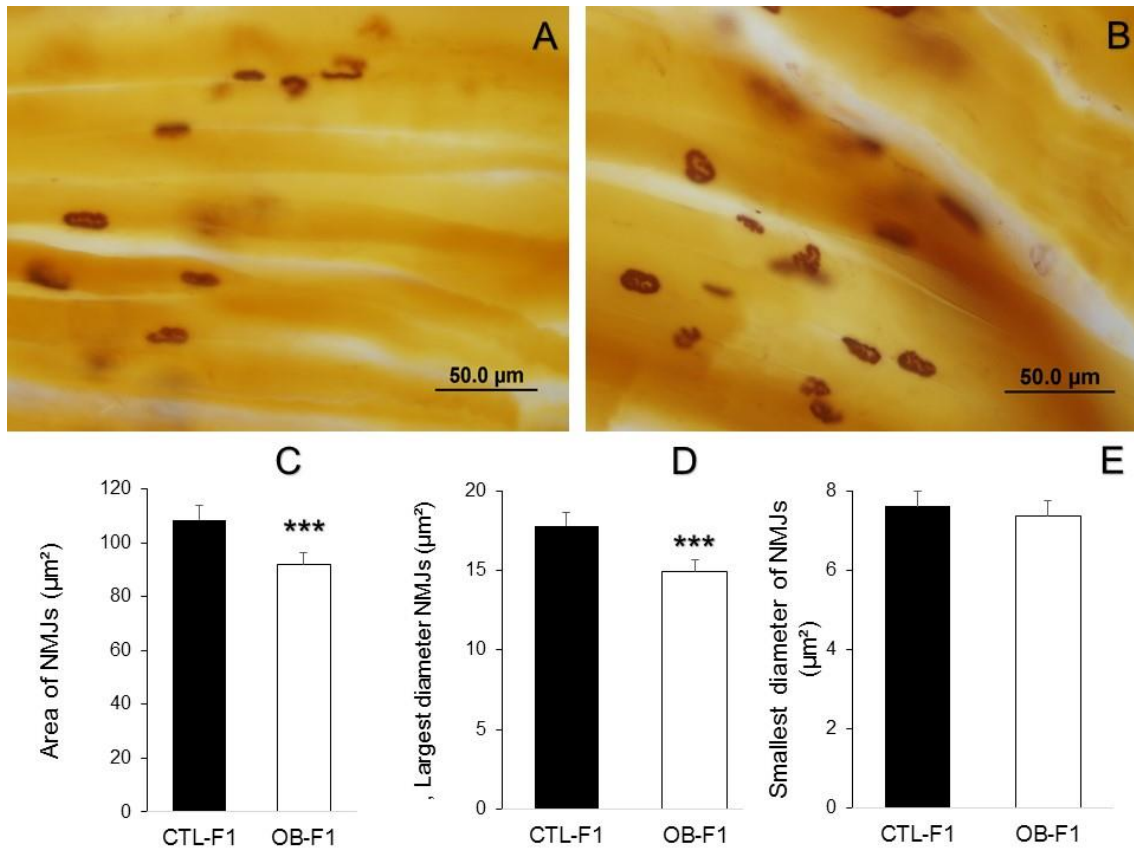


Figure legends

Figure 1. Photomicrographs of the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Cross-section. A and B: Muscle fibers (asterisk), peripheral nuclei (white arrow), and blood capillaries (black arrow) in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1), respectively. HE. C and D: Perimysium (asterisk) in CTL-F1 and OB-F1, respectively. Masson's trichrome.

Figure 2. Photomicrographs of the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Cross-section, NADH-TR reaction. A and B: Types I, IIa and IIb muscle fibers in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and to obese dams (OB-F1), respectively. C and D: Area and number of the different muscle fibers types in animals of the CTL-F1 and OB-F1 groups. Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Student *t*-test.

Figure 3. Electron micrographs of the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Longitudinal section. **A:** Preserved muscle fiber with organized sarcomere (S), A-band (A), I-band (I), and Z-line (white arrow). Rat offspring born to control dams (CTL-F1). **B:** Muscle fiber showing disorganization of the Z-line (white arrow), myofibrillar disorganization (key), and dissolution of the Z-line (arrowhead). Rat offspring born to obese dams (OB-F1).

Figure 4. Photomicrographs of the neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus muscle of Wistar rats at 17 weeks of age. Longitudinal section, nonspecific esterase reaction. A and B: Observe the morphological characteristics of NMJs in rat offspring born to control dams (CTL-F1) and offspring born to obese dams (OB-F1), respectively. C, D and E: Area, largest diameter and smallest diameter of NMJs in animals of the CTL-F1 and OB-F1 groups. Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Student *t*-test. *** $p < 0.0006$.

ARTIGO CIENTÍFICO 2
SUBMETIDO À REVISTA OBESITY SURGERY (ANEXO C)

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA CIRURGIA BARIÁTRICA
NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS NA PROLE DE
RATAS OBESAS**

**Alterações morfológicas da cirurgia bariátrica no músculo extensor longo dos
dedos na prole de ratas obesas**

Camila Kuhn¹, CarolineCovatti¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹, Sandra Lucinei
Balbo¹, Marcia Miranda Torrejais¹

¹ Programa de Mestrado em biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do
Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil

Autor Correspondente:

Camila Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário, Cascavel, PR, Brasil

E-mail: camilaquir@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: Perturbações durante o período fetal podem resultar em anormalidades metabólicas, através da programação metabólica, dentre elas a obesidade. Com intuito de reduzir seus efeitos, as cirurgias bariátricas surgem como opção para seu enfrentamento. Entretanto, os efeitos de tais procedimentos nos descendentes de mães operadas ainda é escasso. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da cirurgia de derivação gástrica em Y de *Roux* (DGYR) na morfologia da fibra muscular e junção neuromuscular (JNM) da prole de ratas submetidas à DGYR. **Métodos:** Ratas *Wistar* de três semanas de vida foram separadas aleatoriamente em dois grupos: 1) CAF FO que recebeu dieta de cafeteria e foi submetida a falsa operação e 2) CAF DGYR, que recebeu dieta de cafeteria e foi submetida a DGYR. A prole da primeira geração (F1) foi nomeada conforme o tratamento das mães em CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1, os machos foram selecionados e tratados com dieta padrão após o desmame. Com 17 semanas os animais foram eutanasiados e o músculo extensor longo dos dedos (ELD) coletado para processamento de rotina em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, para análise morfológica e morfométrica. **Resultados:** O grupo CAF DGYR-F1 apresentou redução do peso do ELD, área das fibras e relação núcleo/fibra. Ainda aumento no número de fibras do tipo I e IIa e do número de capilares, assim como alterações morfológicas na ultraestrutura e redução na área das JNMs. **Conclusão:** A cirurgia de DGYR expõem a prole, através da programação metabólica, a efeitos degenerativos na morfologia do tecido muscular esquelético.

Palavras-chave: Obesidade, Derivação em Y de Roux, Fibras musculares esqueléticas, Junção neuromuscular, Desenvolvimento fetal.

INTRODUÇÃO

A preocupação com as doenças que acometem os adultos e sua relação com a vida uterina vem se destacando, pois, perturbações no período fetal podem resultar em alterações metabólicas na vida adulta, através da programação metabólica [1-3]. De alta prevalência na população mundial, a obesidade resulta em impactos negativos na saúde humana, desencadeando as comorbidades que podem ser transmitidas a futuras gerações [4-6].

Nesse contexto, a cirurgia bariátrica surge como opção no enfrentamento da obesidade e suas comorbidades [7]. A cirurgia de derivação gástrica em Y de *Roux* (DGYR) é considerada padrão ouro entre as cirurgias [8, 9]. Entretanto, seus efeitos nos descendentes de mães operadas não estão totalmente elucidados [10].

Por ser um tecido altamente dinâmico com capacidade de se remodelar e possuir função fisiológica, atuando como órgão secretor de miocinas e tendo importante efeito em demais órgãos, alterações na estrutura do músculo estriado esquelético, pode acarretar em disfunções físicas e metabólicas [11, 12]. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da cirurgia bariátrica de DGYR na morfologia da fibra muscular esquelética e junção neuromuscular (JNM) da prole de ratas obesas submetidas à DGYR.

METODOLOGIA

Procedimento experimental com as ratas progenitoras

Os procedimentos adotados neste estudo, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unioeste, seguindo as normas para experimentação animal. Foram utilizadas 32 ratas da linhagem *Wistar* com três semanas de vida, mantidas em ambiente com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas que receberam além da dieta padrão para ratos (BioBase, Brasil- 3,8 Kcal/g: 70% de carboidrato, 20% de proteína e 10% de gordura), dieta de cafeteria, segundo Goularte, Ferreira, Sanvitto [13]

(5,4 kcal/g (38,5% de carboidratos, 15% de proteína e 46,5% de gordura), com algumas modificações (Tabela 1) durante todo experimento. Com 18 semanas de vida as ratas foram separadas aleatoriamente em grupo cafeteria falsa operação CAF FO (n=14) que foi submetido a falsa operação e Cafeteria Derivação gástrica em Y de *Roux* DGYR (CAF DGYR) (n=18) que foi realizado a cirurgia de Derivação Gástrica em Y de *Roux* (DGYR). Os cuidados pré e peri operatórios foram realizados segundo Meguid e colaboradores [14].

A cirurgia de falsa operação consistiu em laparotomia exploratória com massagens nas alças intestinais. A cirurgia de DGYR consistiu em redução do volume do estômago e desvio no trato intestinal em reconstrução de Y de *Roux* [15].

O cruzamento dos animais ocorreu com 23 semanas na proporção de um macho para duas fêmeas.

Procedimento experimental com a prole

Animais

O nascimento foi considerado o dia 0 pós-natal e o desmame ocorreu com três semanas, somente os machos foram utilizados para o experimento. A prole obtida (F1) foi nomeada conforme o tratamento das ratas progenitoras em: CAF FO-F1 (n=8) e CAF DGYR-F1 (n=8). Todos os animais da prole receberam dieta padrão desde o desmame até a eutanásia.

Avaliação do peso, obesidade e coleta do músculo extensor longo dos dedos

Com 17 semanas de vida os animais foram eutanasiados. Para avaliação da obesidade, foi utilizado o peso na eutanásia, peso das gorduras retroperitoneal e periepididimal. O músculo ELD foi coletado, teve seu comprimento (mm) mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, Brasil) e pesado em balança digital.

Estudo das fibras musculares

Fragmentos distais do antímero direito do músculo ELD foram congelados em nitrogênio líquido durante dois minutos e armazenado em Biofreezer a -80 °C. Os cortes transversais de sete µm de espessura foram realizados em câmara de criostato (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome). Sendo submetidos, posteriormente a métodos de colorações e reações para o estudo das fibras musculares, conforme descrito a seguir.

Estudo Histológico

Secções transversais do músculo ELD foram submetidas à coloração Hematoxilina-Eosina (HE), conforme técnica de Junqueira e Junqueira [16], permitindo a contagem dos núcleos; contagem e área das fibras musculares; contagem dos capilares e relação capilar/fibra, sendo utilizada a análise de 10 campos microscópicos (objetiva de 40X) para cada animal. Para contagem dos núcleos, contagem das fibras e área das fibras, foram consideradas somente as fibras inteiras dos campos microscópicos. Para contagem dos capilares e relação capilar/fibra, foram consideradas somente as fibras musculares que abrangeram as margens superior e direita, as fibras musculares que tocassem as margens inferior e esquerda foram excluídas.

Estudo histoenzimológico e morfométrico

O metabolismo oxidativo e glicolítico das fibras musculares foi analisado através da reação NADH-TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase), conforme técnica de Pearse [17], modificada por Dubowitz e Brooke [18].

A análise morfométrica das fibras musculares permitiu a mensuração da área e quantificação dos diferentes tipos de fibras musculares (I, IIa e IIb). Para cada animal foram escolhidos dois campos microscópicos aleatoriamente (objetiva de 20X).

Estudo do tecido conjuntivo intramuscular

Fragmentos proximais do antímero direito do músculo ELD foram fixados em formol tamponado para processamento histológico e incluídos em paraplast. Em seguida, os músculos foram emblocados, submetidos a microtomia transversal de sete μm de espessura e corados com Tricômico de Masson para análise do conjuntivo. Foi realizada a mensuração da porcentagem do tecido conjuntivo em dois campos microscópicos aleatórios por animal (objetiva de 20X).

Estudo ultraestrutural das fibras musculares

Os fragmentos distais do antímero esquerdo do músculo ELD foram removidos e fixados em Karnovsky [19] e posteriormente submetidos ao protocolo de microscopia eletrônica de transmissão.

Estudo histoquímico e morfométrico das JNMs

Fragmentos proximais do antímero esquerdo do músculo ELD foram removidos e fixados em Karnovsky [19], seccionados longitudinalmente com auxílio de lâminas de inox e submetidos à reação Esterase Inespecífica [20]. Foram realizadas medidas da área, diâmetros maior e menor de 100 JNMs a partir de imagens microscópicas (objetiva de 20X).

Análise das imagens

O microscópio Olympus Bx60[®] acoplado a câmera Olympus DP71 (Tóquio, Japão), e o programa DP Controller 3.2.1 276 foram utilizados para análise morfológicas e morfométricas das fibras musculares e JNMs. Para a ultraestrutura das fibras musculares o microscópio eletrônico de transmissão (CM100, Philips[®], Holanda) foi utilizado. Todas as análises morfométricas foram feitas utilizando-se o programa Image Pro Plus 6.0[®] (Media Cybernetics, Maryland, USA).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism® (La Jolla, USA), levando-se em consideração os resultados do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Quando em normalidade foi utilizado o teste *t de Student*, enquanto que para os dados que estivessem fora da normalidade foi realizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Parâmetros macroscópicos

Na Tabela 2 observa-se que o grupo CAF DGYR-F1 apresentou redução de 26% no peso corpóreo dos animais ($p < 0,001$), de 29% no peso do músculo ELD ($p < 0,001$), 73% na gordura retroperitoneal ($p < 0,001$), 56% na gordura periepididimal ($p < 0,001$), 6% no comprimento nasoanal ($p = 0,001$) e 4% no índice de Lee ($p = 0,009$) em relação ao grupo CAF FO-F1. O comprimento do músculo ELD ($p = 0,351$) foi semelhante entre os dois grupos (Tabela 2).

Morfologia e morfometria das fibras musculares e do colágeno

As fibras musculares do músculo ELD de ambos os grupos, CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1 apresentaram arquitetura geral preservada, com fibras poligonais, multinucleadas com seus núcleos periféricos, organizada em fascículos e capilares entremeados ao conjuntivo (Figuras 1A e 1B).

A análise morfométrica demonstrou redução de 19% na área das fibras musculares ($p = 0,006$) e 15% na relação núcleo/fibra ($p = 0,007$) no grupo CAF DGYR-F1. Este grupo também teve aumento de 28% no número de fibras ($p = 0,002$) e 17% do número de capilares ($p = 0,004$) no grupo CAF DGYR-F1 quando comparado ao grupo CAF FO-F1.

O número de núcleos ($p= 0,117$) e a relação capilar/fibra ($p= 0,866$) foi semelhante entre os grupos (Figuras 1C, 1D, 1E, 1F, 1G e 1H).

Na análise do tecido conjuntivo ambos os grupos, CAF DGYR-F1 e CAF FO-F1, apresentaram semelhança na porcentagem ($p= 0,491$) (Figura 2A, 2B e 2C).

A reação de NADH-TR permitiu que as fibras musculares fossem classificadas, de acordo com a proposição de Brooke e Kaiser (1970), em fibras do tipo I, IIa e IIb (Figuras 3A e 3B). O grupo CAF DGYR-F1 teve redução de 18% na área das fibras do tipo I ($p= 0,036$), de 24% na área das fibras do tipo IIa ($p= 0,001$) e de 17% na área das fibras do tipo IIb ($p= 0,016$). Em relação a quantificação do número de fibras, o grupo CAF DGYR-F1 apresentou aumento de 39% nas fibras do tipo I ($p= 0,023$) e 30% nas fibras do tipo IIa ($p= 0,017$) comparado ao grupo CAF FO-F1. Sendo semelhante o número de fibras do tipo IIb nos dois grupos estudados (Figuras 3C e 3D).

Avaliação da Ultraestrutura

A avaliação ultraestrutural, na microscopia eletrônica de transmissão mostrou que as fibras estavam organizadas em sarcômeros, seguindo o padrão estriado com bandas claras (banda I) e escuras (banda A), ambos os grupos demonstraram desorganização e dissolução da linha Z e desorganização miofibrilar (Figuras 4A e 4B).

Análise das junções neuromusculares (JNMs)

As JNMs dos dois grupos estudados mostraram-se polimórficas, com formato redondo, oval e elíptico (Figuras 5A e 5B). O grupo CAF DGYR-F1 teve redução de 11% na área das JNMs ($p= 0,028$) em relação ao grupo CAF FO-F1, sendo semelhantes em relação aos diâmetros maior ($p= 0,984$) e menor ($p= 0,792$) das JNMs (Figuras 5C, 5D e 5E).

DISCUSSÃO

Sabe-se que o feto é um reflexo da nutrição e composição corporal, dos suprimentos e da energia recebida da mãe [3], perturbações durante o período gestacional podem resultar em anormalidades metabólicas, através da programação metabólica [21]. A cirurgia bariátrica se mostra eficaz na redução do peso e melhora das doenças metabólicas associadas, entretanto, os efeitos de tais cirurgias nos descendentes de mães obesas operadas não estão esclarecidos [10].

Observou-se neste estudo que a prole de mães obesas que realizaram a cirurgia de DGYR tiveram redução do peso corporal, das gorduras retroperitoneal e periepididimal, quando comparada a prole de mães obesas. A literatura mostra estudos [22, 23] envolvendo cirurgia bariátrica onde também observaram redução do peso da prole. Estes achados podem estar relacionados a fatores no ambiente uterino, que resultam em deficiência de macronutrientes [23]. Esta deficiência, durante o desenvolvimento fetal também explica a redução do comprimento nasoanal dos animais e do peso do músculo ELD dos animais do grupo CAF DGYR-F1 quando comparado ao grupo CAF FO-F1.

A cirurgia de DGYR resulta em redução do volume do estômago e desvio de parte do duodeno, que é o principal local de absorção do ferro, cálcio, vitamina B1 e cerca 50% das proteínas [24]. O músculo estriado esquelético é um reservatório de proteínas e sensível a desnutrição proteica, o déficit proteico durante a gestação acarreta em alterações em suas fases de crescimento e diferenciação [25]. Neste estudo observou-se redução da área das fibras musculares, o que pode estar associado diretamente a redução proteica, presente tanto na dieta de cafeteria das mães, que se manteve durante a amamentação, como também, menor absorção dos nutrientes devido a cirurgia bariátrica.

Foi verificado neste estudo aumento do número de fibras musculares no grupo CAF DGYR-F1, estando relacionado a redução na área destas fibras, já que a hiperplasia

das fibras musculares cessa após o desenvolvimento embrionário [26]. Foi observado também, a redução da relação núcleo/fibra, sendo o domínio nuclear o conceito pelo qual o núcleo é responsável por uma quantidade específica de sarcoplasma [27], com a redução do volume celular, observada neste estudo, há menor demanda proteica, dessa forma as miofibrilas respondem eliminando seus núcleos [28].

O aporte de oxigênio é fundamental para as atividades metabólicas do músculo, que por sua vez é transportado pelos capilares [29], neste estudo observou aumento do número de capilares do grupo CAF DGYR-F1, a cirurgia bariátrica acarreta em redução do ferro [24], o que pode estar associado ao aumento da capilaridade na prole, sendo esta adaptação ao transporte de oxigênio insuficiente durante a gestação e amamentação.

A integridade muscular também é dependente da matriz extracelular, sendo o conjuntivo um dos principais componentes [30]. Neste estudo sua porcentagem foi semelhante entre os grupos. No entanto, em estudo prévio [31] sobre os efeitos da obesidade materna na morfologia do músculo ELD da prole, observou-se redução de 22% na porcentagem do tecido conjuntivo no grupo de prole de mães obesas. Sendo assim, a cirurgia de DGYR não reverteu os efeitos deletérios da obesidade sobre o conjuntivo intramuscular.

Como já mencionado o músculo estriado esquelético é sensível a restrição proteica [25]. Observou-se neste estudo redução na área das fibras do tipo I, IIa e IIb. As fibras do tipo II são predominantemente provenientes de miotubos secundários, que são mais suscetíveis aos agravos nutricionais [32]. Este fator também explicaria a redução do predomínio das fibras IIa e principalmente IIb no grupo CAF DGYR-F1. A privação nutricional acarreta em maior agravo sobre as fibras do tipo II [33], com a redução das

fibras do tipo IIb e redução da área das fibras, maior número de fibras do tipo I foram observadas.

Na microscopia eletrônica de transmissão, foi observado desorganização e dissolução da linha Z, além de desorganização da miofibrila. A perda da integridade estrutural da miofibrila está associada a degradação dos miofilamentos de actina, miosina, nebulina, titina, estes também associados a linha Z [34], dietas hipoproteicas estão associadas a mudanças nas miofibrilas, com desorganização e perda da linha Z e desintegração das estriações transversais do músculo, tais dietas elevam o nível de radicais livres de oxigênio, aumentando a permeabilidade da membrana, com isso há o extravasamento de cálcio para o citosol que por sua vez, ativa as proteases endógenas [34].

Alterações na JNM, local onde ocorre a transmissão do impulso nervoso para o músculo, podem influenciar a transmissão neuromuscular e desenvolvimento da fibra [35]. A cirurgia bariátrica está relacionada a redução da vitamina D e do cálcio circulantes [24]. Estudo mostra [36] que esses elementos estão associados a alterações na estrutura e função das JNMs. Neste estudo foi observado redução da área das JNMs no grupo CAF DGYR-F1, uma vez que as mães submetidas a DGYR podem apresentar deficiência de vitamina D e cálcio [24], afetando, por conseguinte o desenvolvimento da JNM da prole.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da cirurgia bariátrica sobre o músculo estriado esquelético da prole adulta. Dessa forma, observou-se que a prole de mães submetidas a cirurgia bariátrica de DGYR ficaram expostas a programação metabólica com efeitos degenerativos na morfologia e morfometria das fibras musculares, com redução de sua área e da relação capilar/fibra. Ainda aumento no número de fibras do tipo I e IIa e número de capilares. A DGYR também teve efeitos de programação nas JNMs,

sendo observadas também alterações morfológicas na análise da ultraestrutura. Conclui-se desta forma que a DGYR promove alterações significativas na morfologia do músculo estriado esquelético, fundamental para atividades metabólicas e físicas.

REFERÊNCIAS

1. Barker DJP. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr.* 2004;93(446):26-33.
2. Heindel JJ; Vanderberg LN. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr Opin Pediatr.* 2015;27(2):248-53.
3. Ribeiro AM, Lima MC, Lira PIC, Silva GAP. Baixo peso ao nascer e obesidade: Associação causal ou casual?. *Rev Paul Pediatr.* 2015;33(3):340-48.
4. Araújo RPC. A importância dos aspectos interdisciplinares da obesidade. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 2012;11(3):269-70.
5. Aune D, Sen A, Prasad M, Norat T, Janszky I, Tonstad S, Romundstad P, et al. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. *BMJ.* 2016;353:i2156.
6. Lind L, Lind PM, Lejonklou MH, Dunder L, Bergman Å, Guerrero-Bosagna C, Lampa E, et al. Uppsala Consensus Statement on Environmental Contaminants and the Global Obesity Epidemic. *Environ Health Perspect.* 2016;124(5):81-83.
7. Lager CJ, Esfandiari NH, Subauste AR, Kraftson AT, Brown MB, Cassidy RB, Nay CK, et al. Roux-En-Y Gastric Bypass Vs. Sleeve Gastrectomy: Balancing the Risks of Surgery with the Benefits of Weight Loss. *Obes Surg.* 2017; 27(1):154-61.
8. Acquafresca PA, Palermo M, Rogula T, Duza GE, Serra E. Complicações cirúrgicas precoces após bypass gástrico: Revisão da Literatura. *Arq Bras Cir Dig.* 2015;28(1):74-80.
9. Arapis K, Cavin JB, Gillard L, Cluzeaud F, Lettéron P, Ducroc R, Le Beyec J. Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121414.
10. Monson M, Jackson M. Pregnancy After Bariatric Surgery. *Clin Obstet Gynecol.* 2016;59(1):158-71.

11. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183-95.
12. Rissi R, Lemos GA, Ide BN, Camargo RL, Branco RCS, Morato PN, et al. Joint immobilization: effects on muscular tissue of obese and malnourished mice. *Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.* 2016;18(1): 1-10.
13. Goularte JF, Ferreira MB, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr.* 2012;108(8):1511-8.
14. Meguid MM, Ramos EJ, Suzuki S, Xu Y, George ZM, Das UN, Hughes K, et al. A surgical rat model of human Roux-en-Y gastric bypass. *J Gastrointest Surg.* 2004;8(5):621-30.
15. Hao Z, Zhao Z, Berthoud HR, Ye J. Development and verification of a mouse model for Roux-en-Y gastric bypass surgery with a small gastric pouch. *PLoS One.* 2013;8(1):e52922.
16. Junqueira LC; Junqueira LMM. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1983.
17. Pearse AGE. Histochemistry: theoretical and applied. Baltimore: Williams e Wilkins, 1972.
18. Dubowitz V, Brooke M. Muscle biopsy: a modern approach. London: Saunders, 1973.
19. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1965;27:1A-149A.
20. Lehrer GM, Ornstein L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J Biophys Biochem Cytol.* 1959;6:399-406.
21. Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes.* 2015;39(4):633-41.

22. Cummings BP, Graham JL, Stanhope KL, Chouinard ML, Havel PJ. Maternal ileal interposition surgery confers metabolic improvements to offspring independent of effects on maternal body weight in UCD-T2DM rats. *Obes Surg.* 2013;23(12):2042-9.
23. Grayson BE, Schneider KM, Woods SC, Seeley RJ. Improved rodent maternal metabolism but reduced intrauterine growth after vertical sleeve gastrectomy. *Sci Transl Med.* 2013;5(199): 199ra112.
24. Bernert PC, Ciangura C, Coupaye M, Czernichow S, Bouillot JL, Basdevant A. Nutritional deficiency after gastric bypass: diagnosis, prevention and treatment. *Diabetes Metab.* 2007;33:13-24.
25. Alves AP, Dâmaso AR, Dal Pai V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. *J. Pediatr.* 2008;84(3):264-271.
26. Dal-Pai SM, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *R. Bras. Zootec.* 2007;36:21-31.
27. Van der Meer SF, Jaspers RT, Degens H. Is the myonuclear domain size fixed?. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2011;11(4):286-97.
28. Teixeira CE, Duarte JA. Myonuclear domain in skeletal muscle fibers. A critical review. *Arch Exerc Health Dis.* 2001;2(2):92-101.
29. Degens H, Always SE. Control of Muscle Size During Disuse, Disease, and Aging. *Int J Sports Med.* 2006;27(2):94-99.
30. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle Nerve.* 2004;29(2):191-197.
31. Kuhn C. Estudo morfológico do músculo extensor longo dos dedos da prole de ratas obesas submetidas ou não à cirurgia de derivação gástrica em Y de Roux [tese]. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2018.
32. Ward SS, Stickland NC. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition?. *Muscle Nerve.* Mar;14(3):259-67.

33. Oliveira FLC, Oliveira ASB, Schmidt B, Amancio OMS. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *J. pediatr.* 1999;75(5):350-356.
34. Oumi M, Miyoshi M, Yamamoto T. Ultrastructural changes and glutathione depletion in the skeletal muscle induced by protein malnutrition. *Ultrastruct Pathol.* 2001;25(6):431-6.
35. Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, Oladiran OA. Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* 2017;21(9):2348-2356.
36. Gifondorwa DJ, Thompson TD, Wiley J, Culver AE, Shetler PK, Rocha GV, Ma YL, et al. Vitamin D and/or calcium deficient diets may differentially affect muscle fiber neuromuscular junction innervation. *Muscle Nerve.* 2016;54(6):1120-32.

Tabela 1. Composição nutricional dos alimentos da dieta de cafeteria

	Energia (Kcal/100g)	Carboidratos (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Gorduras (g/100g)	Sódio (mg/100g)
Ração padrão (BioBase, Brasil) ^a	295	70	20	10	0
Salame tipo Italiano (Sadia, Brasil) ^b	415	0,56	35	30	2000
Pão bisnaguinha (Nutrella, Brasil) ^b	332	64	6,8	6	356
Salgadinho sabor bacon (Troféu, Santa Helena, Brasil) ^b	496	56	7,6	16	1036
Linguiça mista (Sadia, Brasil) ^b	320	0	18	28	1574
Bolo de chocolate (Renata, Selmi, Brasil) ^b	381	55	4,1	16,2	173,3
Salgadinho de milho (Cheetos, Pepsico, Brasil) ^b	125	17	1,6	5,6	99
Mortadela (Frimesa, Brasil) ^b	317	9,5	13,2	16	2112,5
Marshmallow (Fini, Brasil) ^b	330	80	5	0	47,5
Biscoito de maisena (Zadimel, Brasil) ^b	440	80	11	5	333
Wafer de chocolate (Bauduco, Brasil) ^b	523	63	5	27	177

^a Dados fornecidos pelo fabricante. ^b Dados obtidos através das embalagens.

Tabela 2. Parâmetros macroscópicos dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1) com 17 semanas de vida.

Parâmetros (n=8)	CAF FO- F1	CAF DGYR-F1
Peso corpóreo (g) ^a	409,8 ± 47,11	301,1 ± 33,12***
Peso do músculo ELD (g) ^a	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,01***
Comprimento do músculo ELD (mm) ^a	24,25 ± 1,82	23,62 ± 2,40
Gordura Retroperitoneal (g) ^a	4,23 ± 0,79	1,41 ± 0,57***
Gordura Periepididimal (g) ^a	4,71 ± 1,43	2,09 ± 0,52***
Comprimento Nasoanal (cm) ^b	22,94 ± 0,32	21,50 ± 0,65**
Índice de Lee ^a	322,8 ± 9,48	311,1 ± 5,38**

Valores expressos através da média ± desvio padrão. ^aTeste *t de Student*. ^bTeste *Mann-Whitney*.

** Representa $p < 0,009$ *** Representa $p < 0,0003$.

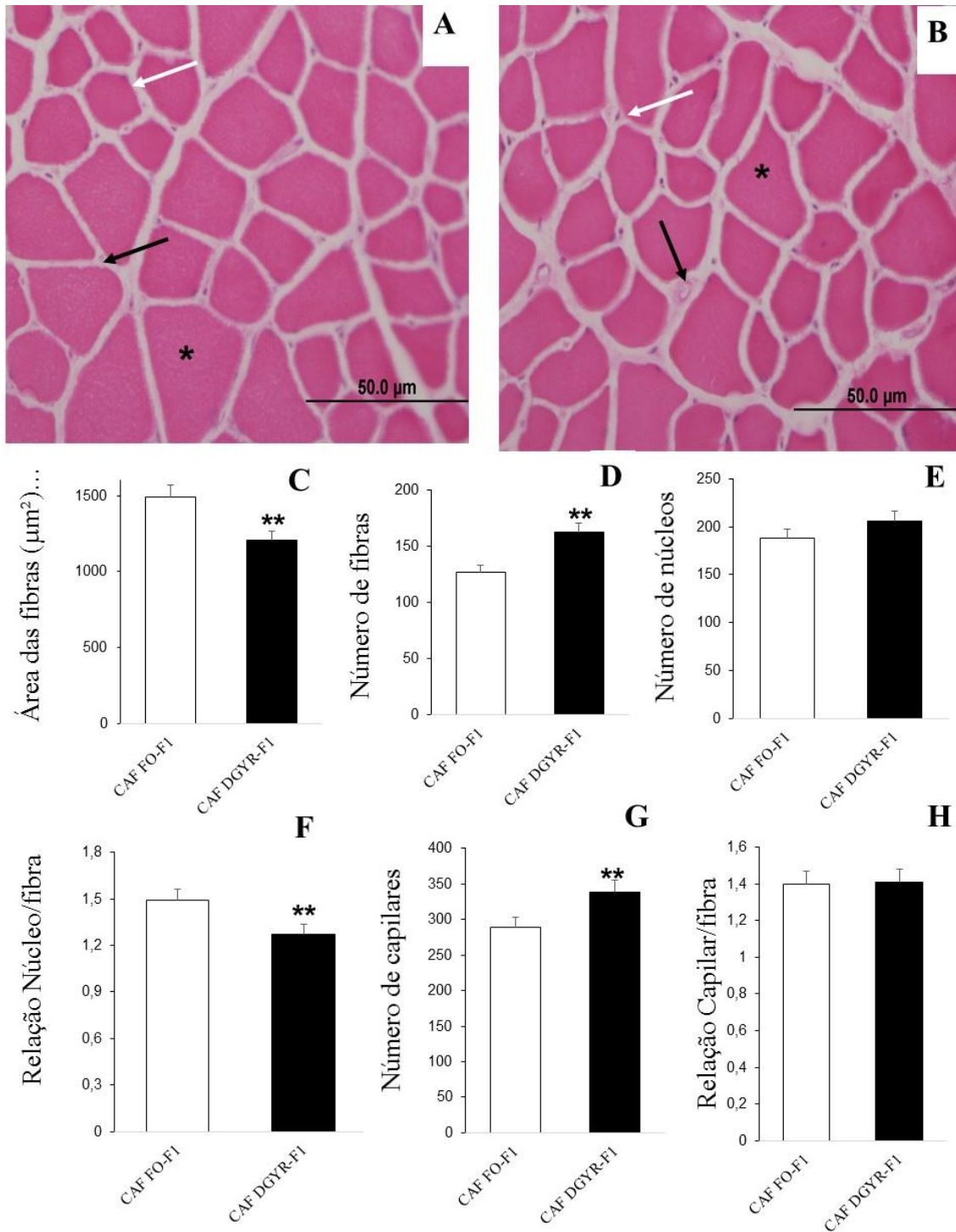


Figura 1- Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* com 17 semanas de vida. Secção transversal. **A e B:** Fibras musculares (asterisco), núcleos periféricos (seta branca) e capilares sanguíneos (seta preta) dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. **HE. C, D, E, F, G e H,** dados de área das fibras, número de fibras, número de núcleos, relação núcleo/fibra, número de capilares e relação capilar/fibra dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1, respectivamente. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*. **Representa $p < 0,007$.

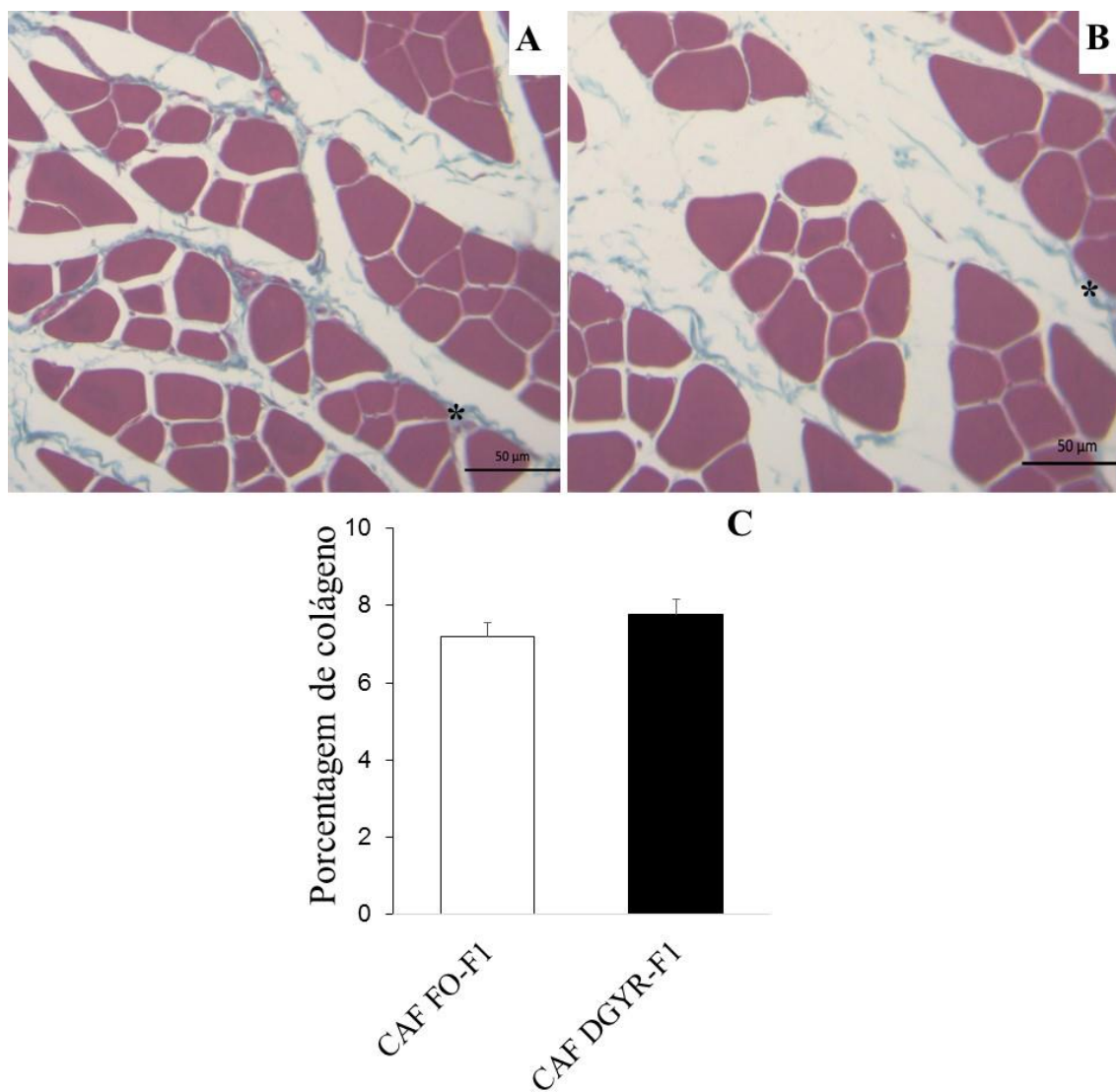


Figura 2. - Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* com 17 semanas de vida. Secção transversal. **A e B:** Perimísio (asterisco) dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1). Tricrômico de Masson.

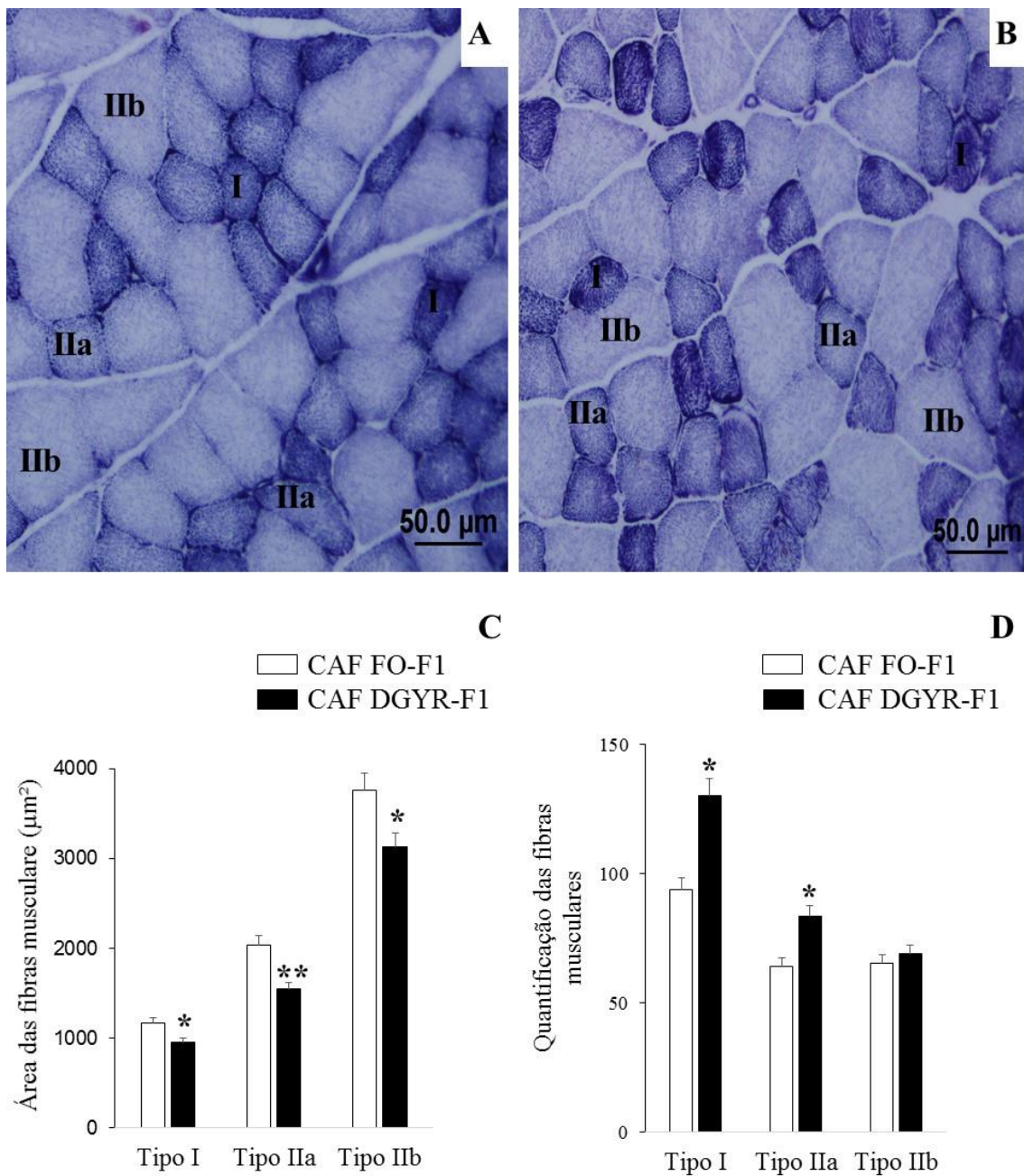


Figura 3 - Fotomicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 semanas. Secção transversal, reacção de NADH-TR. **A e B**: Fibras musculares dos tipos I, IIa e IIb nos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. **C e D**: Dados da área e contagem dos diferentes tipos de fibras musculares nos animais dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*. *Representa $p < 0,05$. **Representa $p < 0,002$.

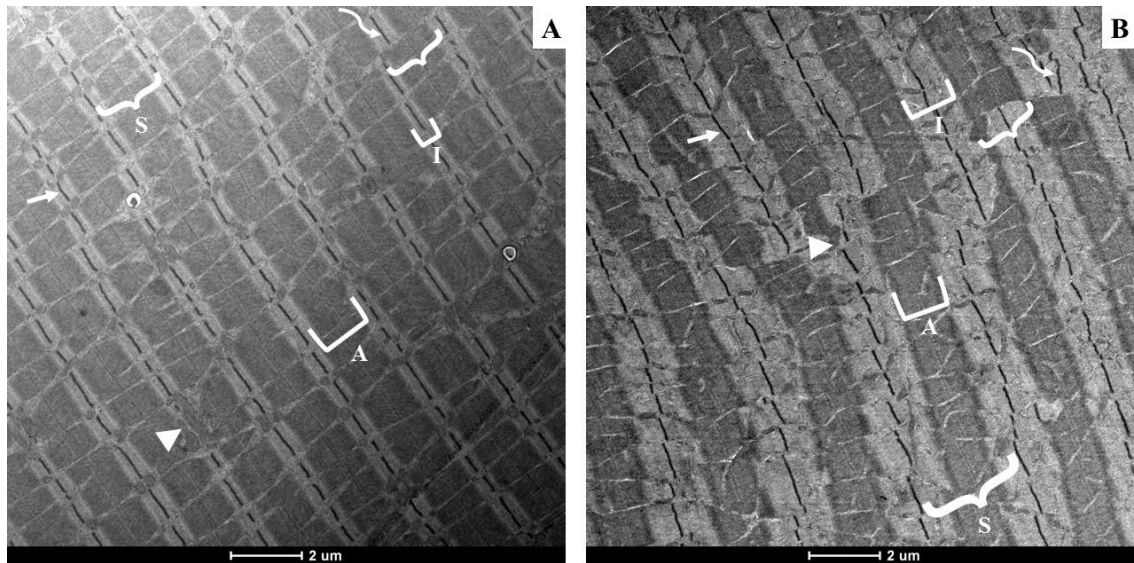


Figura 4. Eletromicrografias do músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 semanas. Secção longitudinal. **A e B:** Fibra muscular com as estruturas do sarcômero (S), banda A (A), banda I (I) e linha Z (seta branca), desorganização da linha Z (seta curva), desorganização miofibrilar (chave) e dissolução da linha Z (cabeça de seta). Grupo prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente.

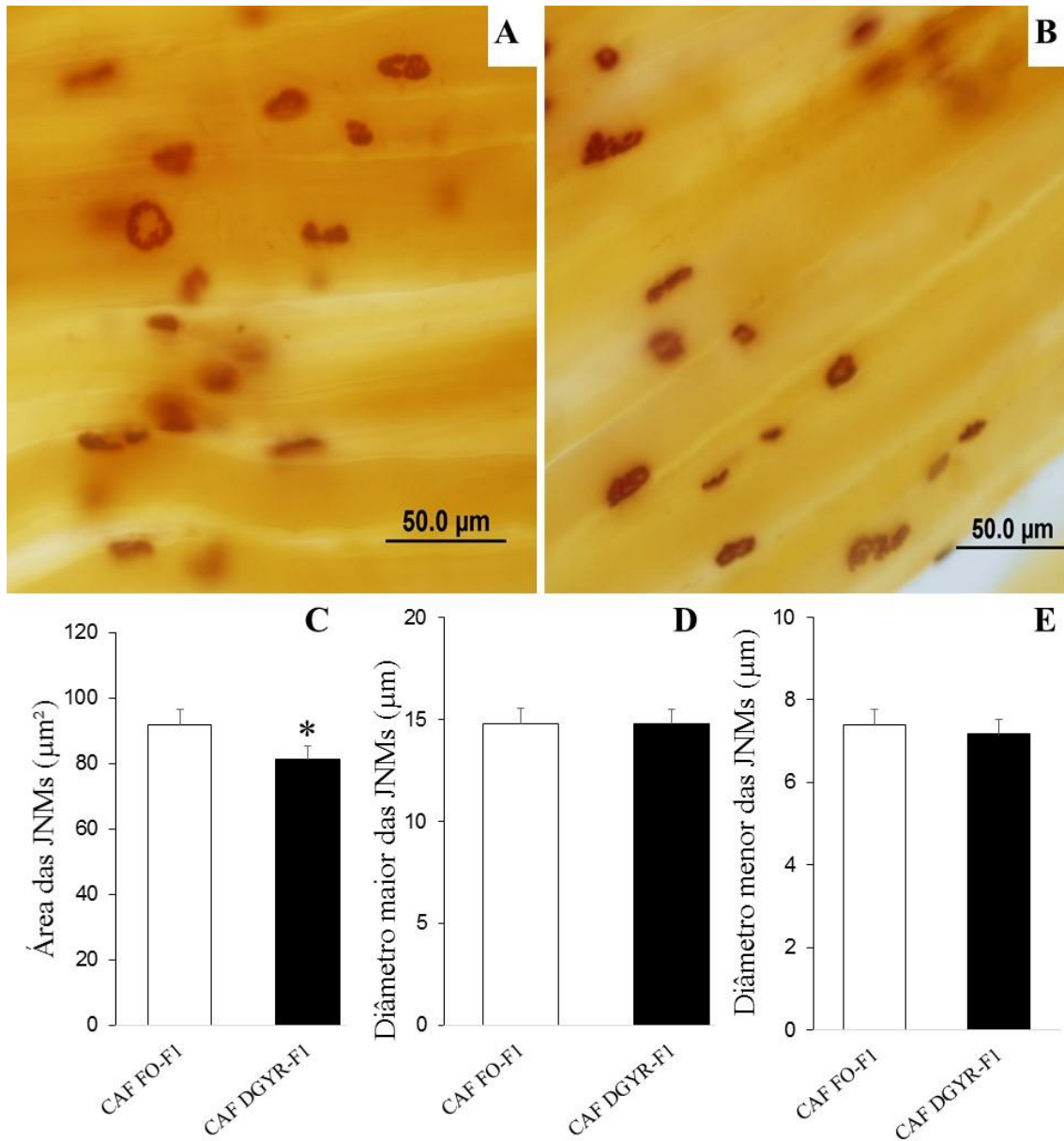


Figura 5. Fotomicrografias das junções neuromusculares (JNMs) no músculo ELD de ratos *Wistar* as 17 semanas. Secção longitudinal, reação de Esterase Inespecífica. **A e B:** Observar as características morfológicas das JNMs dos grupos prole de ratas cafeteria falsa operação (CAF FO-F1) e prole de ratas cafeteria DGYR (CAF DGYR-F1), respectivamente. **C, D e E:** Dados de área, diâmetros maior e menor das JNMs dos animais dos grupos CAF FO-F1 e CAF DGYR-F1. Valores expressos através da média \pm desvio padrão. Teste *t de Student*. *Representa $p < 0,03$.

ANEXO A

Certificado do comitê de ética



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Homeostase glicêmica e lipídica da prole de ratos obesos submetidos à derivação gástrica em Y de Roux", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/02/2015

Profa. Dra. Luçiana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO B

Normas da revista científica- International Journal of Development Research

Instructions for Authors

The **International Journal of Development Research (IJDR) (ISSN 2230-9926)** publishes high-quality solicited and unsolicited articles, in English, in all areas of the subject. The journal welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and academic excellence. All articles published in IJDR will be peer-reviewed. Papers will be published in the next issue of the journal after acceptance. The **International Journal of Development Research (IJDR) (ISSN 2230-9926)** will be published monthly (one volume; 12 Issues per year) by Academe Research Journals.

Electronic submission of manuscripts is strongly encouraged, provided that the text, tables, and figures are included in a single Microsoft Word file (preferably in Arial font).

Submit manuscripts as e-mail attachment to the Editorial Office at:

articles@journalijdr.com; editor@journalijdr.com

A manuscript number will be e-mailed to the corresponding author same day or within 72 hours.

The **cover letter** should include the corresponding author's full address and telephone numbers and should be in an e-mail message sent to the Editor, with the file, whose name should begin with the first author's surname, as an attachment. The authors may also suggest two to five reviewers for the manuscript (IJDR may designate other reviewers).

The International Journal of Development Research (IJDR) (ISSN 2230-9926) will only accept manuscripts submitted as e-mail attachments.

Article Types Three types of manuscripts may be submitted:

Regular articles: These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications: A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new models or hypotheses, innovative methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are 2 to 4 printed pages (about 6 to 12 manuscript pages) in length.

Review: Submissions of reviews and perspectives covering topics of current interest are welcome and encouraged. Reviews should be concise and no longer than 4-6 printed pages (about 12 to 18 manuscript pages). Reviews manuscripts are also peer-reviewed.

Regular articles

All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page.

The **Title** should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote.

The **Abstract** should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The Abstract should be 100 to 200 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 **key words** that will provide indexing references to should be listed. A list of non-standard **Abbreviations** should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used.

The **Introduction** should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed

interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The **Discussion** should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The **Acknowledgments** of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

References: In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Abayomi (2000), Agindotan et al. (2003), (Kelebeni, 1983), (Usman and Smith, 1992), (Chege, 1998; Chukwura, 1987a, b; Tijani, 1993, 1995), (Kumasi et al., 2001)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., A. Kingori, University of Nairobi, Kenya, personal

communication). Journal names are abbreviated according to Chemical Abstracts. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

Examples:

Ogunseitan OA (1998). Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:695–702.

Gueye M, Ndoye I, Dianda M, Danso SKA, Dreyfus B (1997). Active N₂ fixation in several *Faidherbia albida* provenances. *Ar. Soil Res. Rehabil.* 11:63-70.

Charnley AK (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer CJ, Prior C (eds) *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin.* Oxford: CAB International, pp 181-190.

Mundree SG, Farrant JM (2000). Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscasa* Baker. In Cherry et al. (eds) *Plant tolerance to abiotic stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 201-222.

Babalola OO (2002). Interactions between *Striga hermonthica* (Del.) Benth. and fluorescent rhizosphere bacteria of *Zea mays*, L. and *Sorghum bicolor* L. Moench for *Striga* suicidal germination in *Vigna unguiculata*. PhD dissertation, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

Short Communications

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. The items of manuscript preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (1) Abstracts are limited to 100 words; (2) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (3) Results and Discussion should be combined into a single section.

Proofs and Reprints: Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. Because IJDR will be published freely online, authors will have free electronic access to the full text (PDF) of the article. Authors can freely download the PDF file from which they can print unlimited copies of their articles.

Copyright: Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

Proofs, Reprints and manuscript charges

Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. Because IJDR will be published online, authors will have free electronic access to the full text (PDF) of the article. Authors can freely download the PDF file from which they can print unlimited copies of their articles. There is no charge for the processing of paper but author(s) of each accepted paper is required to pay the publication charge which is very nominal fees. The fees depends upon the number of pages, number of authors, images etc. Before the accepted paper is published we will intimate the fees in the acceptance letter.

Anexo C

Normas da revista científica- Obesity Surgery

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. ABOUT OBSU Obesity Surgery is published by Springer Science+Business Media LLC and is the official journal of the International Federation for the Surgery of Obesity and metabolic disorders (IFSO). Requirements are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals," www.icmje.org.

All manuscripts submitted to OBSU are received, blind-reviewed and decided upon through the online Editorial Manager (EM) System center. URL: <http://www.editorialmanager.com/obsu>

Letters to the Editor addressing previously published articles, and any invited Replies, do not need to be blinded. Articles that are accepted for publication are done so with the understanding that they, or their substantive contents, have not been and will not be submitted to any other publication.

2. SUBMISSION CHECKLIST Authors: Make sure that all the items below are ready and available when you submit.

TITLE PAGE REQUIRES:

- Full Title, and Short Title for Running Head
- All Contributing Authors, FullNames/Degrees, and EmailAddresses/Affiliations
- "Correspond To" Information
- Detailed Acknowledgments, FundingInformation, and non-blinded COI Statement

MAIN MANUSCRIPT TEXT REQUIRES:

- Blinded Text
- Abstract (N/A for Letters to the Editor; optional for BriefCommunications)
- Required Ethical, COI, and Human/Animal Rights Statements(blinded)
- References in PubMed® style
- Tables(Optional)
- Figure Legends (if providing figures)

FIGURES/IMAGES:

- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, use TIFF format.
- Figure width should be 39 mm, 84 mm, 129 mm or 174 mm, and no higher than 234 mm
- No identifying information about patients
- Patient and/or publisher permissions, if needed

VIDEO/ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL:

- Any Video or multimedia in either .MP4 or .MOV file format χ Supplementary videos not to exceed two (2) minutes in length
- Narration in English

REQUIRED OFFICIAL ICMJE CONFLICT OF INTEREST FORM(S):

- One form completed by each author (ex: 5 authors = 5 forms)

REQUIRED FOR REVISIONS ONLY:

- One copy of clean, revised text, tables and figures
- One copy of annotated, revised text, tables and figures
- A Point-by-Point Reply to Reviewer Comments (blinded)

3. IMPORTANT SUBMISSION INFORMATION

3a. SYSTEM REQUIREMENTS Authors will need the following items in order to use EM:

- Internet access
- A current Adobe Acrobat browser plug-in
- Electronic files of all required documents.

3b. YOUR AUTHOR ACCOUNT

Authors entering the journal's EM site for the first time can create a new account at <http://www.edmgr.com/obsu/> by clicking "Register Now," and then following the online prompts in order to create your account and submit a manuscript. NOTE: If you have previously accessed the system, always use your existing account for ALL subsequent submissions. If you have forgotten your Username or Password, use the "Send Login Details" link at the OBSU Login Page.

3c. **ONLINE SUBMISSION** After you have logged into your account and entered your Submission Center, EM will lead you through a step-by-step manuscript submission process. The required documents for all online submissions include the main, blinded manuscript document, a separate Title Page document, and a Conflict of Interest (COI) form, which must be completed by each contributing author.

Note: Always keep original copies of your word-processing, graphic, video, and COI files.

Make sure that all required online fields are completed before attempting to submit; the system won't allow you to submit if any required fields are not completed. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and later re-enter the process at the same step by clicking on the "Incomplete Submissions" link in your Author Main Menu.

3d. SUPPORT AND ASSISTANCE

If you have questions or need assistance at any point during the submission and review process, contact our OBSU Managing Editor:

Attn: Deana Rodriguez Managing

Editor, OBSU Editorial

Office Phone: +001 (562) 961-9928

E-mail: obsu.rodriguez@gmail.com

4. MANUSCRIPT PREPARATION

4a. JOINT STATEMENT BY THE SURGERY JOURNAL EDITORS GROUP 2018

We, the editors of surgery journals, believe that conducting sex-inclusive biomedical and clinical research is imperative to improving health outcomes of men and women. Recent studies have shown that the majority of biomedical research in the field of surgery and related topics is conducted on male animals and male cells, even when studying diseases prevalent in women. Human clinical research suffers from a lack of sex-based reporting and sex-based analysis of the results. Given these findings, the National Institutes of Health (NIH) has now asked that sex be considered as a biologic variable in all NIH-funded research. As such, we support uniform, defined reporting of the sex used for human, animal, tissue, and cell research in ALL manuscripts published in our journals. If only one sex is reported, authors must include a justification statement as to why only

a single-sex study was conducted. We also will require sex-based reporting and analysis of data for all human, animal, tissue, and cell research. As a group, we will require this among all our collective surgery journals.

4b. MANUSCRIPT TERMINOLOGY

Please make note of the required manuscript terminology standards.

Mandatory

- Weight loss must be expressed as change in BMI or %total weight loss (%TWL)

Optional

- Weight loss can be expressed as % Excess Weight Loss (%EWL), with the calculation of ideal body weight as that equivalent to a BMI of 25 kg/m² and/or % Excess BMI Lost (%EBMIL) with excess BMI > 25 kg/m² as well as % total body weight loss.
- Data extending beyond 30 days must include lost to follow-up information in the Abstract and Results section, including all tables and figures, with the denominator provided as to how many patients were available at each time point and the number of patients actually seen.

4c. MANUSCRIPT SECTIONS AND FILE ITEMS

When you upload your manuscript documents to EM, the system will ask you to indicate the manuscript file "Item." Your manuscript should be submitted in various parts; for example, your blinded "Manuscript" should be uploaded separately from the "Title Page" and "Official Conflict of Interest Form." Images should be submitted separately, as should any electronic supplementary material (or "Other") and videos (either as supplementary videos or as dedicated video submissions).

Use the following text format guidelines.

- Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- Double-space the text, and set page borders at one inch.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents; do not use the space bar for indents.

i. File Item: Title Page (required)

In the "File Upload" section of EM, your Title Page should be submitted separately from the blinded text of the manuscript, under the category, "Title Page." This page will not be seen by reviewers and should include the following:

- Complete title of the article, and a shortened title (max 30 characters, including spaces).
- Complete names, titles, departments and institutional addresses of each contributing.
- "Correspondence to" followed by the name and contact information for the corresponding author.
- Any detailed grant information and an acknowledgment of grantsupport.
- Acknowledgments: Individuals, other than authors, who directly participated in the work.
- A non-blinded version of your Conflict of Intereststatement.

ii. File Item: Blinded Manuscript – Main Text (required)

In the "Attach Files" step (final step) of your submission, the "Manuscript" file should include the Main Text (which should include blinded statements regarding conflict of interest, consent and ethics), References, and Figure Legends (if any). Tables may also be included at the end of the text document, or submitted separately.

The main text document should be double-spaced and for most submissions include: Abstract (required for all but Letters; optional for Brief Communications); Introduction/Purpose; Materials and Methods; Results; Conclusion; Blinded Conflict of Interest Disclosure Statement; Statements regarding ethics and consent (see details below); References (see details below); Tables, and any Figure Legends (if applicable). Additional format requirements and details for specific manuscript types are included in the "Manuscript Types and Formats" section below.

Conflict of Interest Disclosure, Ethical Statement and Consent Statement Three required statements are required just before the list of References. For each author, the blinded COI statement must declare potential conflict of interest for each author ("author 1, author 2," etc.), or state, "no conflict of interest." For more information, refer to "Ethical Responsibilities of Authors" below.

References

- Use Medline® /Pubmed® Style. Visit the following website for sample references: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

- Type references double-spaced; list them in consecutive, numerical order as they appear in the text.
- Identify reference citations in the text by numbers in square brackets (e.g., [1]). Once a reference is cited, all subsequent citations should be to the original number.
- Cite all references within the text or tables.
 - Papers that have been accepted for publication or are in press may be listed in the References, but OBSU does not reference unpublished data or personal communications.

Tables

- Use the table function (not spreadsheets) to make tables.
- Number all tables using Arabic numerals.
- Always cite tables in the text in consecutive, numerical order.
- For each table, supply a title; it should explain clearly and concisely the components of the table.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the tablebody.
- All tables should be on separate page(s) at the end of the main document, and be cited in the text.

iii. File Item: Official Conflict of Interest Form – (required)

Every contributing author must electronically complete the official ICMJE Conflict of Interest (COI) form. Click on http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf to download a PDF of the form. During submission, please make sure that you upload all COI forms at the end of your submitted documentlist. If any author's COI form is missing from the submission, it will be returned to the author for correction prior to review. Each author must complete the form even if no conflict of interest exists. All details in the ICMJE COI forms must correspond with the COI Disclosure Statement included in the manuscript text. Reviewers will not see these forms.

Note: If you have trouble viewing the ICMJE COI form after downloading, make sure to open the PDF directly from your “downloads” folder via Adobe Reader rather than through your internet browser. Also, once uploaded to the submission site, the forms may not appear clearly in the PDF proof, depending on your browser. Please simply

make sure that a completed form has been uploaded for each contributing author before you complete your submission.

iv. File Item: Cover Letter (optional; non-blinded)

You may submit a non-blinded Cover Letter under this File Item, as well as any other nonblinded documents such as Permission documents or Language Editing certificates.

v. File Item: Figure / Image (optional; blinded for review)

Common graphics files such as GIF, JPEG, EPS, TIFF and many others are supported. Do not upload figures as PDF files. All figures must be numbered using Arabic numerals. Figure parts should be denoted by lowercase letters. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. For each figure, include the figure legends at the end of the manuscript text. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Photographs of patients in which the subject is identifiable must either have the face masked out, or be accompanied by written permission from the individual in the photograph for publication. If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format.

Vector Graphics: The preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Line Art: Must be black and white with no shading. Ensure that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide. Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a min. resolution of 1200 dpi. Halftone Art (photographs, drawings or paintings with fine shading, etc.): If magnification is used in photographs, indicate this by using scale bars within the figure. Halftones should have a minimum resolution of 33 dpi.

Combination Art (combination of halftone and line art): Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art: Color art is free of charge for online publication. If the print version will be published in black and white, make sure that the information will be visible; many colors are not distinguishable when converted to black and white. You may choose to use

patterns rather than colors in such instances. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits/channel).

Lettering and Numbering in Figures: Helvetica and Arial (sans serif fonts) text are preferred. Keep lettering size consistent throughout (preferably 2-3 mm / 8-12 pt). Avoid shading and other text features, and do not include titles or captions within your figures.

vi. File Item: Other (optional; blinded for review)

If your submission file does not fit any of the above file designations, you may submit as "Other," but any document submitted under this File Item must be blinded for review purposes.

vii. File Item:

Video (blinded for review) Videos may consist of information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings; or information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, or large original data (e.g. additional tables, illustrations, etc.). If supplying any multimedia, the text must make specific mention of the material as a citation (e.g., "as shown in Animation 3").

Requirements for Supplementary Videos and Dedicated Video Submissions

Upon submission of articles that include video, the author(s) will be required to submit according to the following specifications:

- Always use either .mp4 or .mov files.
- Keep the video length / size as precise as possible. Some authors and reviewers may experience problems when uploading, downloading or viewing larger files, depending on server speed and other external factors.
- For Supplementary Video files, videos should not exceed two (2) minutes in length. • Dedicated Video submissions must be accompanied by a textual Abstract.
- For any Dedicated Video files larger than 500 MB, authors may upload compressed files (e.g., zip files), or submit in separate video sections.
- All narration should be in English.

4d. MANUSCRIPT TYPES AND FORMATS

The manuscript types include Original Contributions, New Concepts, How I Do It, Review Articles, Brief Communications, Letters to the Editor, and Dedicated Video Submissions.

You may submit your manuscript either as Format I, II, or III (detailed in the Table below). Each manuscript type requires a specific submission format. When required by the nature of the report, manuscripts that do not follow these formats may be accepted. Please note that the page, word and figure limits shown should be used as a guideline rather than a rule; the editors and reviewers make the final evaluations. Please remain succinct in your wording.

MANUSCRIPT FORMATS The double-spaced page and word counts below are a *guideline* rather than a *rule*. Title Page, references, figures, legends, and tables are not considered in the page/word counts below.

FORMAT I	Description	Pp/wds	Main Text	Figure	COI Forms
Original Contribution	Papers involving clinical or basic science research	8pp / 2400 words	<ul style="list-style-type: none"> Title only Structured Abstract, includes subheadings (250 words) Key Words Introduction/Purpose Materials/ Methods/ Results/ Conclusion Blinded COI/Ethics/ Consent Statements References Figure Legends (if any) Tables (if any) 	Up to 6	Official ICMJE Conflict of Interest forms must be completed by each contributing author (these are not viewable in the PDF Proof or to reviewers) http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf
New Concept	All innovative technologies, devices, procedures or treatment protocols; should include a detailed description of the procedure and the results.				
How I Do It	A description of a technique or operative procedure of interest.				

FORMAT II	Description	Pp/wd	Main Text	Figure	COI Forms
Review Article	A scholarly literature review of a current topic. May be solicited or unsolicited.	10pp /3000 words	<ul style="list-style-type: none"> Title only One-Paragraph Abstract (125 words) Typically these are invited submissions; format varies based on topic. Blinded COI/Ethics/ Consent Statements References Figure Legends (if any) 	Up to 6	Official ICMJE Conflict of Interest forms must be completed by each contributing author (these are not viewable in the PDF Proof or to reviewers) http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf
Brief Communication	A short report that can present research, an innovated concept or procedure, or a small case series with important, but very straightforward results.	5pp / 1500 words	<ul style="list-style-type: none"> Title only One-Paragraph Abstract (Optional; 125 wds) Intro /Methods/Results / Conclusion Blinded COI/Ethics/ Consent Statements Limit references to ten (10) Figure Legends (if any) 	Up to 2	
Letter to Editor (re: previously published articles)	A brief report of an opinion or unstructured comment on a published paper. The editors reserve the right to accept, reject or excerpt letters without changing the views expressed by the author(s).	4pp / 1200 words	<ul style="list-style-type: none"> Title page and main text do not need to be blinded. No Abstract required Unstructured COI/Ethics/ Consent Statements Limited number of references 	Up to 3	

FORMAT III	Description	Pp/wd	Main Text	Figure	COI Forms
Dedicated Video	Manuscripts submitted as dedicated video submissions must be accompanied by a textual Abstract that briefly describes the video.	2pp /500 words	<ul style="list-style-type: none"> Textual Abstract includes blinded Title page, Introduction, Materials/ Methods/ Results/ Conclusion/ Blinded Statements, Refs (if any) Blinded video(s) in .mp4 or .mov format only; not to exceed 10 minutes, with narration in English. 	N/A	Official ICMJE Conflict of Interest forms must be completed by each contributing author (these are not viewable to reviewers) http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf

4e. ADDITIONAL SUBMISSION DETAILS

i. Language Editing Services

Language Editing Services, when needed, can be acquired through the Springer author service

<http://authorservices.springernature.com/> .

ii. Special Characters

The Journal does not assume responsibility for errors in conversion of customized software, newly released software, or special characters. Indicate any special characters used in the file (e.g., Greek, math symbols) by providing a clarifying list of abbreviations at the end of your manuscript text.

iii. Abbreviations, Drug Names, Digits

Use the standard abbreviations and units listed in Scientific Style and Format: The CBE Manual

for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition (Reston, Va., Council of Biology Editors,

1994). The first time an uncommon abbreviation appears in the text, it should be preceded by the full name for which it stands. Generic **names** for drugs and chemicals should be used the first time the drug or chemical is mentioned in the text and, preferably, thereafter. If an author wishes, the trade name may be inserted in parentheses following the generic name the first time the generic name appears, and the manufacturer name and city should also be included. Express digits as numerals except when they are the first word in a sentence, and decimals should be written in North American format. Express units of measurement in the metric system whenever possible, and abbreviate them when used with numbers.

5. ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to address potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results that could damage the trust in the journal and ultimately the entire scientific endeavor. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which includes:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the authors own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.
- Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received from all co-authors and responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out *before* the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted *after* acceptance of a manuscript.

- Requests to add or delete authors at revision stage or after publication is a serious matter, and may be considered only after receipt of written approval from all authors and detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. The decision to accept the change rests with the Editor-in-Chief of the journal.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been proven, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

5a. DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could influence or bias the work. Although an author may not feel there are conflicts, disclosure of relationships and interests affords a more transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of real or perceived conflicts of interests is a perspective to which the readers are entitled and is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests *that are directly or indirectly related to the research* may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs

- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. The corresponding author will include a blinded summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s). For review purposes, the affiliations may be identified, but the authors may not.

See below for examples of disclosures:

- **“Funding:** This study was funded by X (grant number X).”
- **“Conflict of Interest:** Author 1 has received research grants from Company A. Author 2 has received a speaker honorarium from Company B and owns stock in Company C. Author 3 is a member of committee D.”

If no conflict exists, the authors should state:

- **“Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.”

5b. STATEMENT OF HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. The following statements should be included in the text before the References section:

i. Ethical Approval

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

For studies with animals, the following statement should be included:

“All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, Springer recommends including the following sentence:

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

For retrospective studies, add the following sentence: “For this type of study formal consent is not required.”

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies e.g. have the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered and to what they have said e.g. during a study or an interview as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) has given written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included: **Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should also be included: “Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

6. RESEARCH DATA POLICY

The OBSU journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature’s list of repositories and research data policy.

List of Repositories <http://www.springernature.com/gp/authors/research-datapolicy/repositories/12327124?countryChanged=true>

Research Data Policy <http://www.springernature.com/gp/authors/research-datapolicy/faqs/12327154?countryChanged=true>

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

7. MANUSCRIPT SUBMISSION

7a. SUBMISSION STEPS

i. Submission Process

Please view a copy of the Submission Checklist at the beginning of this document. We recommend that you have all items listed in the checklist complete and ready for upload before starting your online submission. Make sure to submit a separate title page that includes complete authors' names, affiliations, and addresses in proper author order. Please submit all other documents first (main text, figures, tables, etc.) before uploading your COI forms.

ii. Review Your Submission

After uploading the files for your submission, the system will convert the files to PDF. Make sure to review the PDF of your submission before you confirm your submission. Please note that documents that are not viewable to reviewers (cover letter, title page, COI forms, etc.) may not appear in your PDF proof; simply make sure that they have been successfully uploaded in your list of uploaded documents. Once you have reviewed your PDF document for completeness, click "Submit" and all contributing authors will receive an emailed confirmation. If the submission is not complete when the editorial office receives it, it will be returned to your Author Center, with an e-mail notification indicating the need for additional information or correction. Once a complete manuscript is correctly submitted, your manuscript will be properly reviewed.

7b. KEEPING TRACK

After submission, you may monitor the progress of your submission through the review process.

Only the submitting author can view the submission, and *must enter the same User Name and*

Password that was originally used to submit the manuscript to access the submission details.

7c. EDITORIAL REVIEW AND ACTION

The editorial staff examines submitted manuscripts for accuracy and completeness and will

customarily send most manuscript submissions to two reviewers. We aim for quick reviewer

turnaround times, and rely on the promptness and thoroughness of our volunteer reviewers.

8. AFTER ACCEPTANCE

If your manuscript is accepted, you will receive a link to the special Springer web page with

questions related to:

8a. COPYRIGHT TRANSFER STATEMENT

After acceptance of a paper, a copyright transfer statement signed by the corresponding author is required and must be uploaded to Production via the My Publication stage.

8b. AUTHOR PROOFS

After a submission is accepted and the copyright has been completed, the author receives emailed notification of proofs from the Springer Production Office. The author is solely responsible for ensuring that the author-approved proofs are complete and accurate before approving them. Substantial changes in content are not allowed at the proofs stage, and no changes can be made after an article proof has been approved and has been officially published

Online First. If changes are required after this stage, an erratum may be necessary.

8c. OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. Regrettably, Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Go to: <http://www.springer.com/gp/openaccess/springer-open-choice> for more information about this option.

8d. PUBLICATION OF COLOR FIGURES

Color figures may be used without charge for the electronic version of the journal that is published online via SpringerLink. However, color figures will appear in the print version of the Journal at the author's expense of \$1,150 per article. You may provide your choice at the Springer web page.

8e. OFFPRINTS/ REPRINTS

Can be ordered via the Springer web page.