

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROTEÍNA NO MÚSCULO SÓLEO, DE RATOS  
OBESOS NÃO EXERCITADOS, DURANTE RESTRIÇÃO CALÓRICA.

JÚLIA PASQUAL

SÃO CARLOS –SP  
2025

JÚLIA PASQUAL

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROTEÍNA NO MÚSCULO SÓLEO, DE RATOS  
OBESOS NÃO EXERCITADOS, DURANTE RESTRIÇÃO CALÓRICA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção de título de  
Bacharel em Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal de São Carlos- UFSCar.

Orientação: Profa. Dra. Anabelle Silva  
Cornachione

SÃO CARLOS-SP  
2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

Pasqual, Júlia

Efeitos da suplementação de proteína no músculo sóleo, de ratos obesos não exercitados, durante restrição calórica. / Júlia Pasqual -- 2025.  
37f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Anabelle Silva Cornachione

Banca Examinadora: Wladimir Rafael Beck, Tiago da Silva Alexandre

Bibliografia

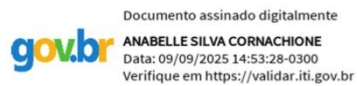
1. Obesidade. 2. Restrição Calórica. 3. Suplementação de Proteína. I. Pasqual, Júlia. II. Título.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

JÚLIA PASQUAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos- UFSCar.

Orientador(a)

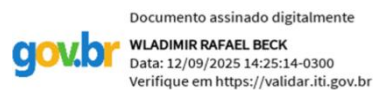


---

Dra. Anabelle Silva Cornachione

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Examinador(a)

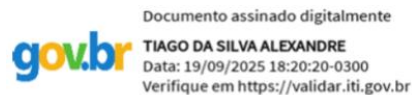


---

Dr. Wladimir Rafael Beck

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Examinador (a)



---

Dr. Tiago da Silva Alexandre

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

# APOIO FINANCEIRO



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de  
São Paulo (FAPESP; 2024/00008-6)

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, por me ensinarem, até hoje, a importância do esforço, da dedicação e da perseverança. Por todo o apoio e incentivo aos estudos e principalmente por permitirem que eu realizasse o sonho de estudar em uma universidade pública. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também aos amigos que fiz durante a graduação, em especial Ana Paula Moraes, Daniel Cometta, Victor Gerke, Sarah Salvador e Giovana Bernardes, pelos momentos que passamos juntos, dividindo alegrias e frustrações. Graças a vocês o caminho foi mais leve.

Também deixo aqui o agradecimento à minha orientadora Prof. Dra. Anabelle Silva Cornachione, por me conceber a oportunidade de participar do seu laboratório e por todo aconselhamento e orientação durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os amigos e colegas do LFBM pelo companheirismo e pelas valiosas trocas de conhecimento. Em especial, à Rosangela Aline, pela paciência, instrução e ajuda essencial na realização dos experimentos, e ao Khayyam Mahler, pela companhia nos cafés da tarde e principalmente por tornar o dia a dia no laboratório mais divertido.

Aos colegas que me acompanham desde o Ensino Médio, Kamilly Fontanetti e Vinicius Rocha Caetano, agradeço pelo companheirismo e por se tornarem família.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado, Raul, pela paciência, apoio e ajuda nos momentos mais desafiadores deste trabalho.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigado.

## RESUMO

A obesidade atua como fator de risco para múltiplas doenças crônicas e provoca alterações relevantes em diferentes tecidos, em especial o músculo esquelético. O desequilíbrio entre miocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nesse processo pode prejudicar tanto a integridade estrutural quanto a função contrátil do músculo. Terapias nutricionais, como a restrição alimentar (RA) vem sendo estudadas e, sobretudo, se mostram efetivas contra obesidade. Porém, a depender do tempo e magnitude de aplicação, esta pode promover além da perda de gordura, a perda de massa magra (músculo esquelético), comprometendo ainda mais a morfologia e função do tecido. Para minimizar esta perda, estratégias como a suplementação de proteínas são efetivas em músculos submetidos a treinamento, porém pouco se sabe sobre seus efeitos em músculos esqueléticos em situações restritas ao emagrecimento. Dessa forma, o objetivo do estudo foi analisar os efeitos da suplementação de proteína animal no trofismo e nos tipos de fibras do músculo sóleo de ratos obesos, sob situação de restrição calórica. Métodos: foram utilizados 42 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos divididos em 7 grupos (n=6): Controle 8 semanas (GC8), Controle 16 semanas (GC16), Obeso (GO), *ad libitum* (Gal), Restrição Alimentar 20% (GDC20), Restrição Alimentar 60 % (GDC60) e Restrição Alimentar com suplementação de proteína (GWP). Após os procedimentos, os animais foram eutanasiados sob anestesia e o músculo sóleo coletado para análise histológica e morfométrica. A partir da análise dos resultados obtidos pode se concluir que a suplementação de proteína na dieta de animais sob restrição calórica de 60% atuou como fator protetivo no tecido muscular esquelético, preservando o diâmetro das fibras do músculo sóleo.

Palavras-chave: músculo esquelético. obesidade. proteína. restrição calórica.

## ABSTRACT

Obesity is one of the main triggering factors for various chronic diseases, leading to significant changes in tissues such as skeletal muscle. The great increase in pro- and anti-inflammatory myokines during this process may compromise the trophic and functional aspects of the muscle. Nutritional therapies, such as caloric restriction (CR), have been studied and shown to be effective against obesity. However, depending on the duration and magnitude, CR may lead not only to fat loss, but also to the loss of lean mass (skeletal muscle), further impairing the morphology and function of the tissue. To minimize this loss, strategies such as protein supplementation have proven effective in trained muscles, but little is known about their effects on skeletal muscle under weight-loss-specific conditions. Therefore, this study aims to analyze the effects of animal protein supplementation on the tropism and fiber types of the soleus muscle in obese rats under caloric restriction. Methods: Forty-two male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used and divided into seven groups (n= 6): 8 Week Control (GC8), 16 Week Control (GC16), Obese (GO), *ad libitum* (Gal), 20% Caloric Restriction (GDC20), 60% Caloric Restriction (GDC60), and Caloric Restriction with Protein Supplementation (GWP). After the procedures, the animals were euthanized under anesthesia and the soleus muscle was excised for histological and morphometric analysis. Based on the analysis of the results obtained, it can be concluded that protein supplementation in the diet of animals under 60% calorie restriction acted as a protective factor in skeletal muscle tissue, preserving the diameter of the soleus muscle fibers.

Key-words: caloric restriction. obesity. protein. skeletal muscle.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização dos tipos de tecido adiposo.	13
<b>Figura 2</b> - Método de confecção da ração hiperlipídica.	21
<b>Figura 3</b> - Esquema didático referente ao cálculo realizado para suplementação.	21
<b>Figura 4</b> - Whey Protein utilizado para suplementação de proteína.	22
<b>Figura 5</b> - Excisão do músculo sóleo em animal eutanasiado.	23
<b>Figura 6</b> - Criostato Leica CM 1520	24
<b>Figura 7</b> - Image Xpress Micro XLS	25
<b>Figura 8</b> - Fotos ilustrativas da técnica de histologia HE.	26
<b>Figura 9</b> - Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência acompanhadas de gráficos estatísticos de tipagem de fibra e diâmetro menor.	29

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Método de confinamento de cada grupo e sua respectiva sigla.	18
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
AMPK	Proteína Quinase Ativada por 5'-Adenosina Monofosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON16	Grupo Controle 16 semanas
CON8	Grupo Controle 8 semanas
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
FTI	Fibras tipo I
FTIC/ IIC	Fibras tipo IC/IIC
FTII	Fibras Tipo II
g	Gramas
GAL	Grupo Ad libitum
GDC20	Grupo Déficit Calórico 20%
GDC60	Grupo Déficit Calórico 60%
GO	Grupo Obeso
GWP	Grupo Whey Protein
HE	Hematoxilina- Eosina
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular
LMBBM	Laboratório Multiusuário de Bioquímica e Biologia Molecular
MHC	Cadeia Pesada da Miosina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RA	Restrição Alimentar
TA	Tecido adiposo
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

mg Miligrama

### **LISTA DE SÍMBOLOS**

% Por cento/ Porcentagem

® Marca registrada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Obesidade	13
1.2 Tecido adiposo	13
1.2.1 Tecido adiposo e inflamação associada à obesidade	14
1.3 Tecido Muscular	15
1.3.1 Músculo estriado esquelético	16
1.3.2 Músculo sóleo	16
1.3.3 Obesidade e músculo esquelético	16
1.4. Estratégias de combate à obesidade	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Animais	19
3.2 Dieta Hipercalórica e Restrição Alimentar	20
3.3 Procedimento de Suplementação com Whey Protein	22
3.4 Obtenção e Preparo das Amostras	23
3.5 Histologia e Imunofluorescência	24
3.5.1 Imunofluorescência para marcação de tipo de fibra	25
3.6 Análises estatísticas	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	31

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica com ocorrência de caráter global, caracterizada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como uma condição na qual ocorre um armazenamento excessivo de tecido adiposo no corpo, representando riscos significativos à saúde (World Health Organization, 2000). Seu diagnóstico é realizado principalmente através da aplicação do Índice de Massa Corpórea (IMC), parâmetro estipulado pela OMS, que consiste na análise do valor obtido através da divisão do peso (em quilos) pela altura ao quadrado (em metros). De acordo com os critérios da OMS, um indivíduo apresenta peso adequado quando seu IMC varia entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>. Valores a partir de 30 kg/m<sup>2</sup> já indicam obesidade, que pode ser subdividida de acordo com sua gravidade (OMS, 2000). Sendo a obesidade Grau 1 caracterizada por valores de IMC entre 30–34,9, Grau 2 valores entre 35–39,9 e Grau 3 valores  $\geq 40$ ) (Ferreira & Wanderley, 2010, Klatsky et al, 2017).

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e a Síndrome Metabólica (ABESO), a estimativa é que 2,3 bilhões de pessoas ao redor do mundo estejam acima do peso, sendo que, dentre elas 700 estão com obesidade, ou seja, com IMC acima de 30. Sobre o Brasil, os dados mostram que a porcentagem de indivíduos obesos na população aumentou 72% no período entre 2006 e 2019. Já para Nilson e Rezende (2024), quase metade dos brasileiros (48%) serão obesos até o ano de 2044, e mais 27% da população apresentará sobrepeso.

A obesidade é uma condição resultante do desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético diário, resultando em ganho de peso excessivo e consequentemente acúmulo de gordura corporal. O combate a este quadro é dificultado pela sua etiologia de caráter multifatorial, envolvendo condições genéticas, ambientais, comportamentais, metabólicas e neuroendócrinas. Outras causas da obesidade incluem redução da atividade física, insônia, uso de medicamentos (por exemplo, corticosteróides), consumo excessivo de carboidratos e alimentos ricos em açúcar, e metabolismo energético reduzido (Blumenkrantz, 1997, Jebb 1997).

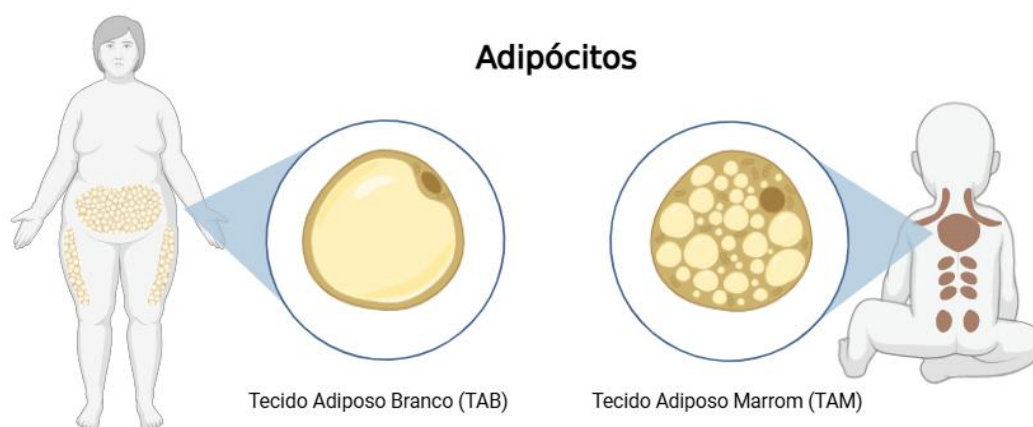
### 1.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo TA é um tipo de tecido conjuntivo formado por células adiposas, sendo o principal reservatório energético do organismo. Essas células podem estar isoladas, em pequenos grupos ou ainda em forma de grandes agregados. O tecido adiposo (TA) pode ser

subdividido de acordo com sua localização e sua composição: o TA branco, também chamado de unilocular, possui células que apresentam uma única gotícula de gordura que ocupa quase todo o citoplasma. Já o TA marrom, ou multilocular, é formado por células com numerosas gotículas de lipídios e grande número de mitocôndrias, responsável pela cor característica (Junqueira & Carneiro, 2017).

O TA multilocular é especializado no processo de produção de calor, chamado termogênese, participando assim de forma ativa na regulação da temperatura corporal. Sua distribuição em indivíduos adultos é reduzida, sendo mais encontrado em fetos e recém nascidos.

**Figura 1** - Localização dos tipos de tecido adiposo.



**Fonte:** autoria própria, 2025.

De acordo com a localização, o TA pode ser chamado de subcutâneo, que se localiza logo abaixo da pele, ou visceral, que é encontrado entre os órgãos internos (Medrades, 2022) A obesidade quando analisada em nível celular se trata do aumento na quantidade de triglicerídeos depositados em cada adipócito unilocular (Junqueira & Carneiro, 2017). Essas células podem se expandir de duas maneiras para estocar mais gordura: através de hipertrofia e hiperplasia. A hipertrofia se dá principalmente no tecido subcutâneo e é caracterizada pelo aumento no tamanho das células lipídicas. Já hiperplasia é o nome dado a divisão para formação de novos adipócitos e ocorre principalmente no tecido visceral. A hiperplasia pode ocorrer porque o TA possui células-tronco adiposas que apresentam a capacidade de se diferenciarem em novos adipócitos (Junqueira & Carneiro, 2017, Medrades, 2022).

### 1.2.1 Tecido adiposo e inflamação associada à obesidade

O tecido adiposo também apresenta função endócrina, sendo responsável pela produção e secreção de diversas substâncias, incluindo hormônios como a leptina, que possui função reguladora de apetite, o angiotensinogênio, envolvido no controle da pressão arterial, além de citocinas e marcadores inflamatórios que estão presentes em maior número no organismo de indivíduos obesos, o que caracteriza a inflamação de baixo grau associada ao sobrepeso.

Como dito anteriormente, em um quadro de obesidade ocorre um crescimento exacerbado de tecido adiposo, levando a hipertrofia das células de gordura. Essas células, ao entrarem em um estado de hipóxia, passam a secretar quimiocinas que recrutam macrófagos para o tecido. De acordo com Leite et al. (2010), a hipertrofia dos adipócitos associada à infiltração de células imunes no tecido adiposo leva ao aumento da liberação de marcadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ), IL-6 (Interleucina-6) e IL-1 $\beta$  (Interleucina-1 $\beta$ ), que são indicativos do processo inflamatório crônico de baixo grau observado na obesidade.

Esse estado inflamatório pode resultar no desenvolvimento de diversas enfermidades oriundas da obesidade como resistência à insulina, já que o TNF- $\alpha$  induz os adipócitos a reduzirem sua resposta aos sinais da insulina, diminuindo conseqüentemente a absorção de glicose (Hotamisligil et al., 1994). Além de ser responsável por acometer os mais diversos tecidos, entre eles o músculo esquelético (Wu et al., 2017).

### 1.3. Tecido Muscular

É o tecido responsável por realizar o movimento do corpo através da contração muscular, seja ela voluntária ou involuntária. Apresenta células especializadas para realizar esta função, possuindo formato alongado e alto número de filamentos contráteis, como actina e miosina (Montanari, 2016, p.101). Existem três tipos principais de tecido muscular: estriado esquelético, estriado cardíaco e músculo liso. Os dois primeiros possuem essa denominação devido a forma que os filamentos de actina e miosina se organizam, fazendo com que, ao ser analisado em microscópio de luz, sejam observadas estrias transversais, que estão ausentes no músculo liso. O termo esquelético faz referência à sua localização, pois está associado ao esqueleto, respondendo assim a estímulos voluntários (Ham & Cormack, 1983).

Já o estriado cardíaco possui células cilíndricas e abundante quantidade de mioglobina pelo alto consumo de oxigênio. O músculo liso não apresenta estriações em suas células pois os feixes de filamentos contráteis estão dispostos em diferentes planos. Sua contração ocorre

de forma lenta e é controlada pelo sistema nervoso autônomo, sendo assim involuntária. (Junqueira & Carneiro, 2013).

### 1.3.1. Músculo estriado esquelético

As fibras musculares esqueléticas são classificadas com base na expressão das isoformas da miosina (MHC) e conseqüentemente se diferem quanto ao tipo de contração que realizam.

As fibras do tipo I (FTI), são fibras de contração lenta e são mais resistentes à fadiga, sendo encontradas em grande número em atletas de esportes de longa duração e baixa intensidade, como maratonistas, devido a sua alta capacidade oxidativa e eficiência no uso de oxigênio. Já as fibras tipo IIa (oxidativas rápidas) e IIx (glicolíticas rápidas) apresentam maior velocidade e força de contração (Plotkin et al, 2021, Schiaffino & Reggiani, 2011). Dessa forma, estão em maior quantidade em praticantes de atividades de explosão e de curta duração, como levantadores de peso, por exemplo. Ainda existem as fibras consideradas mistas ou híbridas, que expressam mais de uma isoforma de miosina, apresentando assim, características intermediárias entre os tipos I e II. Além disso, devido à plasticidade muscular, as fibras podem mudar de tipo em resposta a certos estímulos como alterações hormonais, exercícios de força ou resistência e mudanças na dieta (Jianin Li et al, 2024, Plotkin et al, 2021).

### 1.3.2 Músculo sóleo

Localizado na região posterior da perna, o músculo sóleo compõe, junto ao gastrocnêmio, o tríceps sural, grupo muscular essencial para a manutenção da postura e para movimentos de flexão plantar graças a sua composição predominante de fibras tipo I, resistentes à fadiga. Além disso, possui, em menor quantidade, fibras oxidativas rápidas e uma pequena porção de fibras híbridas do tipo IIC (Soukup et al, 2002, Tasi & Dimov, 2009).

O sóleo de ratos é foco de diversas pesquisas, devido a suas características como a alta sensibilidade à alterações em seu recrutamento. De forma que, quando exposto a períodos de inatividade apresenta atrofia muscular acentuada e redução de força. Também apresenta importante função metabólica, sendo utilizado para estudar resistência à insulina em indivíduos obesos, por exemplo (Yoshihara et al, 2021, Crettaz et al 1980).

### 1.3.3 Obesidade e músculo esquelético

A inflamação sistêmica característica da obesidade também atinge o músculo esquelético, afetando tanto sua função quanto sua estrutura. Além disso, causa alterações na

homeostase da glicose corporal, já que este tecido é responsável pela maior parte do descarte de glicose, processo estimulado pela insulina (Wu & Ballantyne, 2017).

Dessa forma, as células imunes que se encontram em alto número, juntamente com a liberação de moléculas pró - inflamatórias contribuem para a resistência à insulina e à ocorrência de diabetes tipo 2 (Mengeste et al, 2021, Wu & Ballantyne, 2017).

A obesidade também afeta os tipos de fibra muscular, favorecendo a transição de fibras de contração lenta para fibras rápidas, diminuindo a capacidade de resistência muscular em indivíduos obesos (Tallis et al, 2018). Além disso, prejudica o funcionamento do acoplamento excitação - contração, pois atua negativamente nos sinais de cálcio e na atividade do AMPK. Estes efeitos, somados ao estresse oxidativo e acúmulo de lipídios neste tecido comprometem a função mitocondrial e reduzem a capacidade de geração de força por unidade de massa muscular (Sutham et al, 2018).

Esse estado inflamatório crônico prejudica as células satélites, células-tronco musculares, ao reduzir sua ativação e proliferação, impactando negativamente a regeneração muscular. O aumento de citocinas inflamatórias e a resistência à insulina também dificultam a reparação tecidual, tornando assim a recuperação de lesões musculares em indivíduos obesos um processo lento e pouco eficiente (Akhmedov & Berdeaux, 2013).

#### 1.4. Estratégias de combate à obesidade

A restrição calórica é muito utilizada como ferramenta principal aplicada a fim de mitigar os impactos da obesidade devido aos seus resultados satisfatórios relacionados à perda de peso (Salazar, 2006). No entanto, a depender do tempo de aplicação e da magnitude da restrição calórica, pode haver não somente a perda de gordura mas também perda de massa muscular, mas especificamente músculo esquelético (McCarthy & Berg, 2021)

Com o objetivo de minimizar a perda de massa muscular no processo de emagrecimento, a atividade física é a ferramenta mais utilizada, especialmente exercícios de força com objetivo de hipertrofia. Sua eficácia é potencializada quando associada com suplementação de proteína animal (Pedrosa et al., 2004; Most et al., 2020).

A eficácia da aplicação em conjunto de tais ferramentas na redução da perda de massa magra já está amplamente comprovada e documentada na literatura científica.

No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da suplementação de proteína aplicada isoladamente. Sendo assim, este estudo busca preencher essa lacuna e trazer novas percepções

sobre os efeitos da proteína animal no músculo esquelético em processos de emagrecimento sem a influência de atividades físicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar e quantificar os efeitos determinados pela restrição calórica e pela suplementação de proteína animal no trofismo e na distribuição de fibras do músculo sóleo de ratos obesos não exercitados.

### 2.2. Objetivos específicos

- Induzir o sobrepeso em ratos machos Wistar ofertando ração hipercalórica;
- Identificar e quantificar alterações morfológicas e morfométricas (trofismo e tipo de fibras), através de técnicas de coloração e imunofluorescência do músculo sóleo de ratos machos Wistar que não foram submetidos ao processo de engorda (CON8) e (CON16);
- Identificar e quantificar alterações morfológicas e morfométricas (trofismo e tipo de fibras), através de técnicas de coloração e imunofluorescência do músculo sóleo de ratos machos Wistar após período de engorda (GO);
- Identificar e quantificar alterações morfológicas e morfométricas (trofismo e tipo de fibras), através de técnicas de coloração e imunofluorescência do músculo sóleo de ratos machos Wistar que tiveram acesso *ad libitum* à ração padrão (Gal) após período de engorda;
- Identificar e quantificar alterações morfológicas e morfométricas (trofismo e tipo de fibras), através de técnicas de coloração e imunofluorescência, determinadas pelo sobrepeso no músculo sóleo de ratos machos Wistar submetidos a restrição calórica (RA) de 20% e 60% após período de engorda (GDC20) e (GDC60);
- Identificar e quantificar alterações morfológicas e morfométricas (trofismo e tipo de fibras), através de técnicas de coloração e imunofluorescência do músculo sóleo de ratos machos Wistar submetidos à RA de 60% e suplementados com proteína (GWP), após período de engorda.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 3200240523) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Foram utilizados 42 ratos machos adultos (80 dias) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), obtidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Durante toda a duração do experimento os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas-DCF, localizado na UFSCar, em gaiolas de polietileno, com temperatura ambiente (22 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas) controlados, além de água *ad libitum*.

**Quadro 1-** Método de confinamento de cada grupo e sua respectiva sigla.

Nome do grupo	Sigla do grupo	Quantidade de animais	Método de confinamento na 1ª fase	Método de confinamento na 2ª fase
Controle 8 semanas	CON8	6	Grupo	*
Controle 16 semanas	CON16	6	Grupo	Grupo
Obeso	GO	6	Grupo	*
Obeso <i>ad libitum</i>	GAL	6	Grupo	Grupo
Obeso com déficit calórico de 20%	GDC20	6	Grupo	Individual
Obeso com déficit calórico de 60%	GDC60	6	Grupo	Individual
Obeso com déficit calórico de 60% e suplementado com proteína	GWP	6	Grupo	Individual
Quantidade total de animais = 42				
*Animais eutanasiados no final da primeira fase				

**Fonte:** Autoria própria, 2025

Os animais iniciaram os procedimentos com 80 dias de idade, e foram divididos em sete grupos (n=6):

Grupo Controle 8 semanas (CON8): são animais que tiveram oferta de ração padrão Agromix (50g por animal) durante 8 semanas;

Grupo Controle 16 semanas (CON16): são animais que tiveram oferta de ração padrão Agromix (50g por animal) durante 16 semanas;

Grupo Obeso (GO): são animais que permaneceram sob dieta hipercalórica com oferta de ração hiperlipídica durante 8 semanas (50g por animal);

Grupo *ad libitum* (Gal): são animais que permaneceram sob dieta hipercalórica durante 8 semanas e posteriormente tiveram oferta *ad libitum* de Ração Padrão Agromix por mais 8 semanas;

Grupo Restrição Alimentar 20% (GDC20): são animais que permaneceram sob dieta hipercalórica durante 8 semanas e mais 8 semanas em restrição alimentar de 20% com ração padrão Agromix;

Grupo Restrição Alimentar 60% (GDC60): são animais que permaneceram sobre dieta hipercalórica durante 8 semanas e mais 8 semanas em restrição alimentar de 60% com ração padrão Agromix;

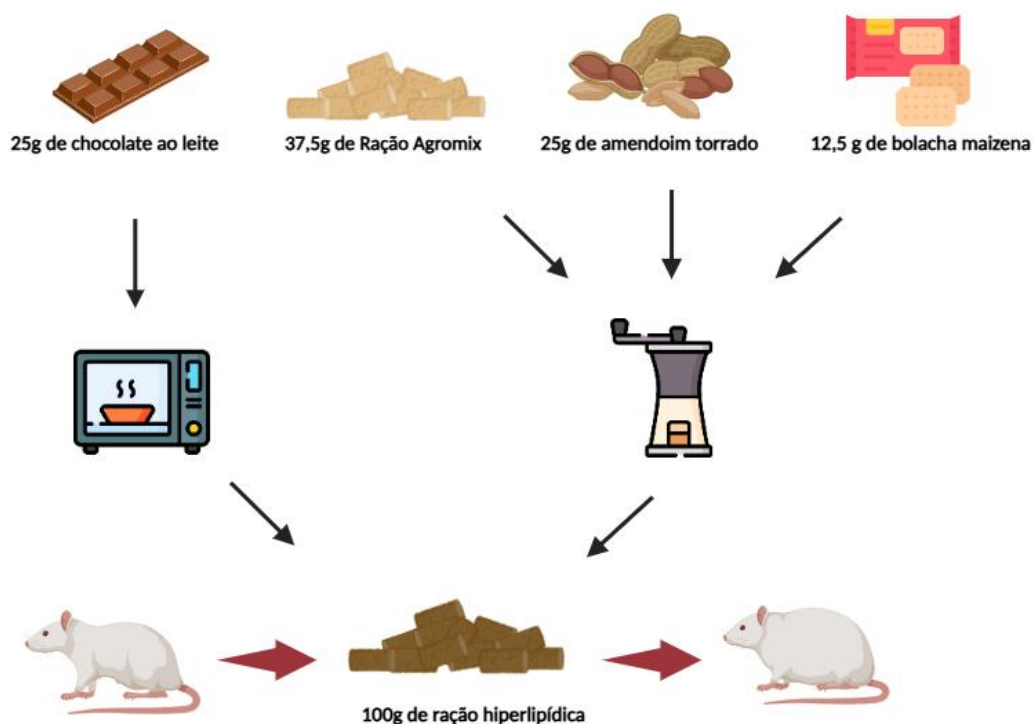
Grupo Whey Protein (GWP): são animais que permaneceram sobre dieta hipercalórica durante 8 semanas e mais 8 semanas de restrição alimentar de 60% com ração padrão Agromix e suplementados com Whey Protein por meio de gavagem com agulha de aço inox BD-12.

### 3.2. Dieta Hipercalórica e Restrição Alimentar

A ração hipercalórica utilizada para a engorda dos animais foi manufaturada no Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular (LFBM)- UFSCar, sua composição respeitou a proporção de de 3:2:2:1, descrita por Furino et al. (2021). Dessa forma, em 100 g de ração hipercalórica, foram utilizados: 37.5g de ração padrão da marca Agromix (Jaboticabal, SP, Brazil); 25g de amendoim torrado; 25g de chocolate ao leite e 12.5g de bolacha maisena.

Todos os ingredientes foram pesados e triturados, com exceção do chocolate ao leite que foi derretido em micro-ondas. Posteriormente os ingredientes foram homogeneizados e modelados no formato de pellets, como demonstrado na figura 2. Após a confecção da ração, a mesma foi ofertada durante 8 semanas para que os animais ganhassem peso, tornando-se obesos.

**Figura 2-** Método de confecção da ração hiperlipídica.



**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Todos os grupos, exceto os grupos controle (CON8 e CON16), se alimentaram de ração hipercalórica por um período de 8 semanas. Após este período, os animais do grupo GO foram eutanasiados. Os demais grupos seguiram seus respectivos protocolos alimentares.

A ração do grupo Gal foi pesada dia sim dia não, com propósito de quantificar a ração consumida pelos animais do grupo, e dessa forma calcular a ração que seria ofertada para os grupos em restrição calórica (GDC20, GDC60 e GWP).

O grupo submetido à suplementação proteica (GWP), teve redução na quantidade de comida (ração padrão) em 60%, em relação ao grupo Gal, com o adicional da suplementação de proteína (Whey protein) suficiente para atingir a quantidade de proteína consumida em ração pelo Grupo Gal. A RA de 60% baseia-se em estudos científicos que apresentaram resultados importantes na perda de peso e comprometimento muscular (Elashry et al., 2019; LIM et al.,1996). A imagem a seguir demonstra de forma ilustrativa o cálculo utilizado para a suplementação.

**Figura 3** - Esquema didático referente ao cálculo realizado para suplementação.



**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Além da pesagem da ração consumida e ofertada, também foi realizada a pesagem diária dos animais para maior controle da oscilação de peso frente às intervenções alimentares.

### 3.3. Procedimento de Suplementação com Whey Protein

Para a suplementação de Whey Protein, foi utilizado o suplemento Clean Pro Whey, da marca Nutrify® (Figura 4). A marca foi escolhida pois apresenta alta densidade proteica, característica que precisou ser levada em consideração para reduzir ao máximo o volume que seria suplementado por gavagem, a fim de diminuir o estresse do animal. Além disso, a suplementação ocorreu 3 vezes ao dia, com o objetivo de simular ao máximo a ingestão de proteína que normalmente ocorre de forma espaçada ao longo do dia, por meio das refeições.

Além de que, quando há a introdução de grande quantidade de solução de suplemento ( $\geq 10\text{ml/kg}$ ), o animal pode apresentar desconforto gástrico e devido ao fato de roedores não conseguirem vomitar, poderiam ocorrer mudanças nas dinâmicas de absorção pela rápida passagem da substância para o duodeno e refluxo passivo para o esôfago.

**Figura 4** - Whey Protein utilizado para suplementação de proteína.



**Fonte:** Autoria própria, 2025.

#### 3.4. Obtenção e Preparo das Amostras

Após os procedimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia (Ketamina 100mg/Kg + Xilazina 100mg/Kg) administrada por injeção intraperitoneal. O músculo sóleo foi excisado, selado em talco, congelado em nitrogênio líquido e as amostras foram armazenadas em criotubos em freezer -80°C.

**Figura 5** - Excisão do músculo sóleo em animal eutanasiado.



**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 3.5- Histologia e Imunofluorescência

Para realização das técnicas de histologia e imunofluorescência, os músculos foram seccionados em cortes transversais com espessura de 6  $\mu\text{m}$ , com auxílio do Criostato Leica CM 1850 UV (Figura 9) à uma temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e coletados em lâminas histológicas Perfecta® 25x75mm. Em seguida, algumas lâminas foram submetidas às colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), procedimento que tem como objetivo a visualização de tecidos e análise dos aspectos genéricos das fibras musculares sob microscopia óptica (Cornachione, Cacao-Benedini, et al., 2008; Cornachione, Cacao-Benedini, et al., 2011). O protocolo aplicado consiste na incubação de 10 segundos a 2 minutos, em solução de Hematoxilina e imersão por 1 minuto e 30 segundos em solução de Eosina e posterior bateria de desidratação e clarificação. Por fim as lâminas foram montadas com meio de montagem Permount®, lamínulas 24 x 50 mm e seladas com esmalte.

A hematoxilina por se tratar de um corante de caráter básico, realiza a marcação de estruturas ácidas (basófilas), como os núcleos celulares (em azul- púrpura), enquanto a eosina, por apresentar um caráter ácido, cora estruturas básicas (acidófilas) como o citoplasma e componentes estruturais (em rosa/vermelho).

**Figura 6 - Criostato Leica CM 1520**



**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 3.5.1 Imunofluorescência para marcação de tipo de fibra

Para a tipagem das fibras musculares foi realizada a técnica de imunofluorescência, para sua realização os fragmentos congelados foram seccionados em Criostato Leica CM 1520 (Figura 9), com espessura de  $6\mu\text{m}$ , à  $-25^{\circ}\text{C}$ . O protocolo contou com incubação dos cortes em anticorpos primários para marcação de diferentes tipos de fibras, **BAD5 IgG** (1:50) para marcação de fibras tipo I, **N3.36 DSHB IgM** (1:20) para marcação de fibras tipo II e **laminin ab11575 IgG Abcam** (1:200) para identificação da membrana celular através da imunomarcção de laminina. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de BSA 1%. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS (Solução salina tamponada com fosfato), e incubadas com os anticorpos secundários: **Alexa Fluor 488 IgM Jackson** (1:200), **Dylight 405 AffiniPure - Jackson** (1:200) e **Alexa Fluor 647 IgG Abcam 150123** (1:200) diluídos em BSA 1%. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e posteriormente fechadas com meio de montagem sem DAPI, lamínulas 24 x 50 mm e esmalte.

As lâminas foram fotografadas com objetiva de 10X no equipamento ImageXpress Micro XLS (Figura 10), localizado no Laboratório Multiusuário de Bioquímica e Biologia Molecular (LMBBM), situado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) -UFSCar.

As imagens obtidas foram analisadas através do software Image J (versão 1.50e, NIH, USA). Todos os diferentes tipos de fibras foram contados em 5 campos aleatórios de 500 x500 µm em cada amostra para a análise de proporção. Além disso, houve a mensuração de 100 fibras musculares por tipo e por amostra, para realização da análise de diâmetro menor de Feret.

**Figura 7** - Image Xpress Micro XLS



**Fonte:** A autoria própria, 2025.

### 3.6 Análises estatísticas

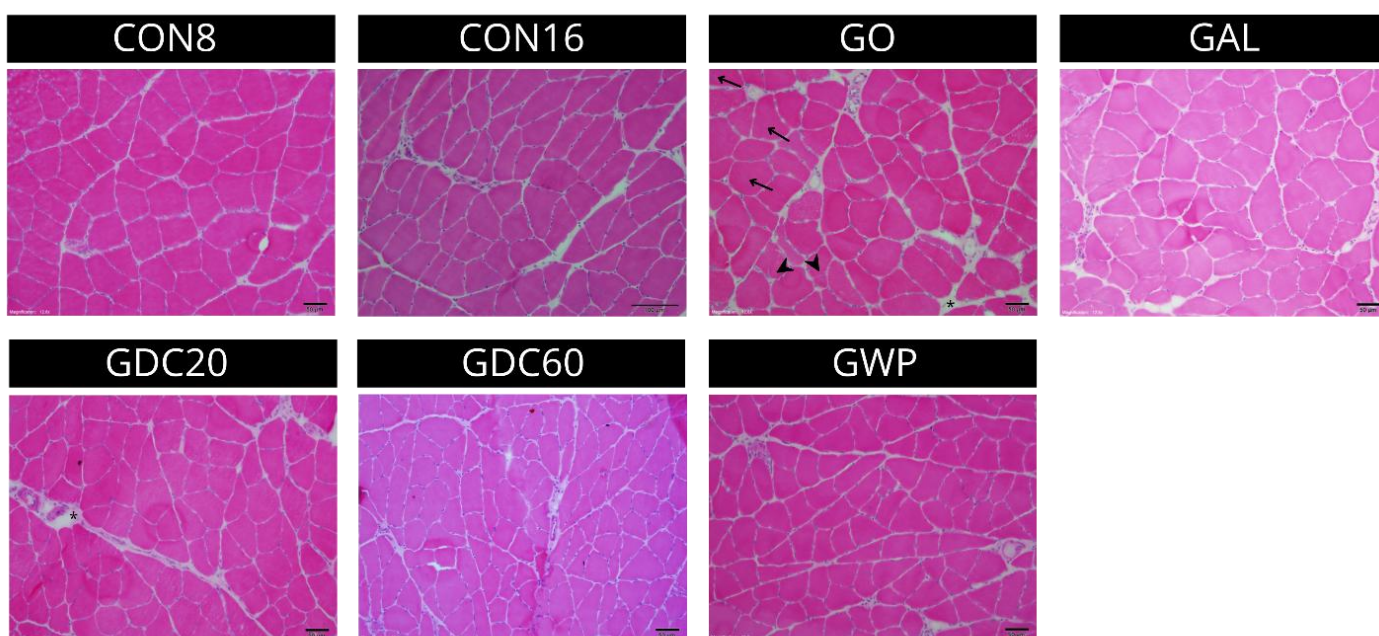
As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 9.0.0., as amostras que passaram nos teste de normalidade de Shapiro-Wilk foram submetidas ao teste One Way ANOVA, para amostras que não se encaixavam nos parâmetros de normalidade foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $\alpha=5\%$ ) com um intervalo de confiança de 95% (IC=95%); ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise qualitativa das lâminas coradas por H.E. é possível observar morfologia normal nos grupos controles, com fibras poliédricas e núcleos periféricos (Figura 8). O grupo

obeso (GO) apresentou algumas alterações morfológicas, como: centralização nuclear, alteração tamanho, *splitting* e aumento significativo de tecido conjuntivo. Delgado-Bravo et al., (2023) observaram aumento expressivo de tecido conjuntivo no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos ao procedimento de engorda. Os grupos GDC60 e GWP apresentaram alterações no tamanho das fibras musculares, enquanto os grupos GDC20 e GAL não mostraram alterações citoarquiteturais expressivas.

**Figura 8** - Fotos ilustrativas da técnica de histologia HE.



**Figura 8** - Fotomicrografias de lâminas do músculo sóleo de ratos coradas com Hematoxilina-Eosina, mostrando de maneira ilustrativa, algumas alterações morfológicas. Objetiva de 20x. Barra de escala 50 µm. Grupos controle (CON8 e CON16) apresentam pouco tecido conjuntivo (\*) quando comparado aos demais grupos. Grupo GO - Variação tamanho das fibras, aumento de tecido conjuntivo (\*), núcleo centralizado (→), e *splitting* (▶). GDC20 - aumento de tecido conjuntivo. GDC60 - apresentou fibras em menor diâmetro e maior quantidade quando comparado aos demais.

Na figura 9A é possível observar a imunomarcagem dos diferentes tipos de fibras, os quais foram analisados tanto para proporção quanto para o trofismo (diâmetro). Os resultados para proporção de fibra mostraram que as fibras de predomínio do músculo sóleo (FTI, oxidativas) foram as que mais sofreram alteração na sua quantidade frente aos procedimentos aplicados.

O Grupo Obeso (GO) reduziu de maneira significativa a quantidade de fibras FTI ( $p < 0.05$ ), fibra predominante no músculo sóleo, quando comparado a todos os demais grupos analisados (Figura 9B). Tal resultado já era esperado como resposta à indução da obesidade,

pois já está consolidado na literatura científica que as fibras oxidativas são prejudicadas em um ambiente obesogênico (Mengeste et al., 2021, DeNies et al., 2014). Estudos conduzidos por He et al., (2001), Goodpaster et al., (2000) e Simoneau et al., (1999), com indivíduos obesos, mostraram um aumento no conteúdo de lipídeos intramuscular associado a resistência à insulina, além de capacidade oxidativa e conteúdo mitocondrial reduzido nesses indivíduos. É sabido que pessoas obesas apresentam níveis mais altos de insulina quando comparados a pessoas não obesas. Tanner et al., (2001) também observaram redução significativa de FTI em pessoas obesas.

Ainda é obscura a relação entre obesidade e alterações nos tipos de fibras, mas acredita-se que as fibras glicolíticas são mais resistentes à insulina, tendo menores consequências frente à obesidade. Holmgang Brzezinska e Bjorntorp (1993) observaram aumento de FTII e redução de FTI em roedores submetidos à infusão de insulina. Mrad et al. (1992) relataram que roedores que ganharam mais massa gorda com alimentação rica em gordura possuíam significativamente menos fibras do tipo I quando comparado aos animais que se alimentaram com ração padrão. Em contrapartida, nossos resultados mostraram aumento de fibras tipo I em todos os grupos experimentais submetidos a procedimentos de perda de peso quando comparados ao grupo GO (GO x grupos experimentais;  $p < 0.05$ ), o que pode inferir em uma melhora no perfil oxidativo acometido pela obesidade e talvez, dos níveis de insulina. Já as fibras de caráter mais glicolítico, como as FTIIA não mostraram alterações frente a sua proporção, independente do procedimento a que os animais foram submetidos. Como já mencionado acima, a relação entre tipos de fibras musculares e obesidade ainda é um campo sem muitas respostas que precisa ser explorado com maior precisão para melhor entendimento nas alterações observadas nesses indivíduos/animais.

Os resultados para o diâmetro menor das fibras apresentaram aumento de todos os tipos de fibras analisados no músculo sóleo de ratos após período de dieta hiperlipídica (GO) em relação aos demais grupos (Figura 9C). Uma justificativa para esse achado é o aumento do volume celular por um possível depósito de gordura intra-miofibrilar. Análises estão sendo realizadas no nosso laboratório (Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular - LFBM), através da técnica de oil red e triglicerídeos intramuscular. Apesar dessas não fazerem parte do escopo deste projeto, resultados prévios têm mostrado aumento de triglicerídeos no músculo sóleo de animais do grupo GO. Mo et al., (2025) observaram depósito expressivo de gordura intracelular de ratos submetidos a ingestão de ração hiperlipídica, através da técnica de oil red. Gerrits et al., (2010) observaram maior quantidade de lipídeos intracelular nas fibras do

músculo vasto lateral em pessoas obesas quando comparadas às pessoas magras, e esse aumento foi significativamente maior em fibras do tipo I.

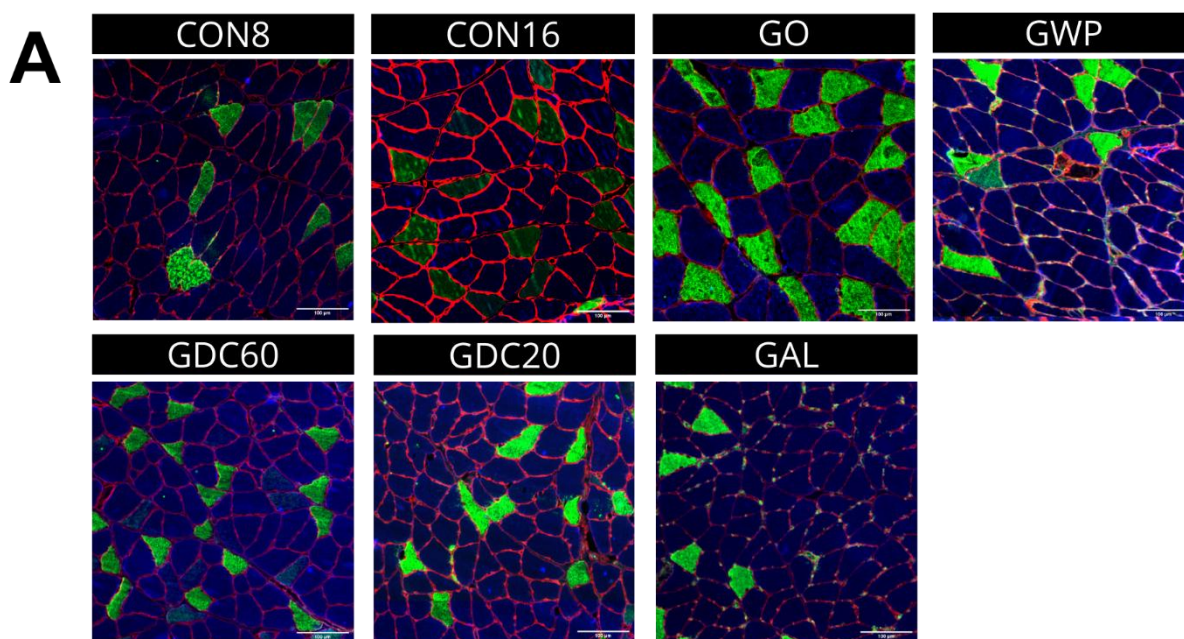
Por outro lado, as restrições calóricas de 20% e 60% (com ou sem suplementação) ou retorno à ingestão da dieta padrão, reduziram de maneira significativa os diâmetros de todas as fibras musculares, quando comparados ao grupo obeso (GO) ( $p < 0.05$ ). No quesito magnitude da restrição, o grupo GDC60 mostrou uma redução mais expressiva, mantendo-se abaixo do respectivo controle (CON16 x GDC60;  $p < 0.05$ ), sugerindo que além da perda de gordura intracelular pode estar ocorrendo perda de massa muscular, concomitantemente. Notavelmente, a perda de massa gorda pode estar associada a perda de massa magra em restrições calóricas de maiores magnitudes. (Heymsfield et al., 2024) A perda de massa muscular, em particular, é uma das mais prejudicadas em dietas com grande restrição, Anyiam et al. (2024) mostraram em seu trabalho que em dietas muito baixas em calorias (cerca de 900 kcal/dia) um terço do peso corporal perdido é proveniente de massa muscular. Tal prejuízo causado ao tecido muscular, com o passar do tempo (envelhecimento), pode determinar consequências motoras e funcionais importantes no indivíduo.

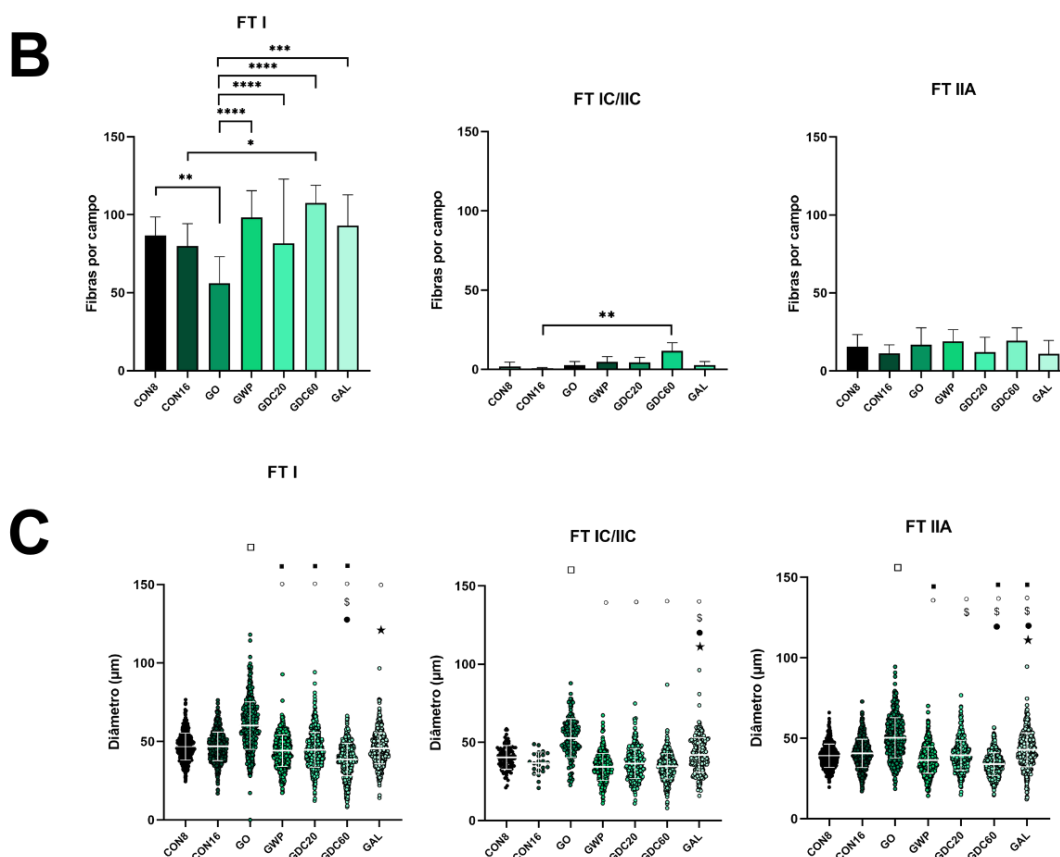
Devido a este fato, é de suma importância que o profissional da saúde possa buscar alternativas que venham poupar a perda de massa muscular durante programas de emagrecimento. De fato, nossos resultados mostram que as fibras musculares do grupo GDC20 parecem ter sido mais poupadas quando comparadas ao diâmetro das fibras do grupo GDC60 (GDC20 x GDC60;  $p < 0.05$ ). Contudo, existem situações clínicas, como obesidade em grau elevado, pré- cirurgia bariátrica entre outras, em que pessoas podem ser submetidas à dietas mais severas, necessitando de intervenções que possam minimizar a perda de músculo mas manter a perda da gordura.

Nossos resultados mostraram que o grupo suplementado com Whey protein durante a restrição calórica de 60% (lembrando que as calorias foram equalizadas nos grupos GWP e GDC60) parece ter poupado a redução do diâmetro das fibras musculares durante o processo de emagrecimento, quando comparado ao GDC60 (GWP x DC60;  $p < 0.05$ ). Pasiakos et al. (2013) mostraram em seu trabalho que uma ingestão de proteína acima da recomendação diária preservou a massa livre de gordura durante a perda de peso. Dito isso, acredita-se que a proteína suplementada pode ter atuado na preservação das fibras, poupando a degradação de proteínas musculares durante a fase de restrição alimentar, corroborando com a premissa de Kim, (2021), no qual mostra o maior aporte de ingestão proteica como fator atenuante da perda de massa muscular no ambiente de restrição calórica.

Por fim, apesar do grupo GAL não ser um dos principais focos de investigação neste estudo, ou seja, ele foi inserido neste projeto para que houvesse o acompanhamento do consumo de ração diária dos animais e assim, pudéssemos submeter os outros grupos às respectivas restrições (20% e 60%). Todavia não podemos deixar de mencionar, os resultados, que este grupo “infere” uma situação de reeducação alimentar (troca da ração hipercalórica por ração padrão), mostrando a importância do consumo de alimentos menos calóricos e mais nutritivos para redução de massa gorda (gordura).

**Figura 9-** Fotomicrografias da técnica de imunofluorescência acompanhadas de gráficos estatísticos de tipagem de fibra e diâmetro menor.





**Figura 9-** Fotomicrografias de cortes do músculo sóleo de ratos marcados com imunofluorescência acompanhados de gráficos estatísticos de tipagem de fibra e diâmetro menor. **A** - Imagem ilustrativa de imunomarcagem para diferentes tipos de fibra, azul (FTI), ciano (FTIC/IIC), verde (FTIIA), barra de escala 100 µm. **B** - Gráficos estatísticos da proporção de fibra de diferentes tipos em músculo sóleo. **C** - Gráficos estatísticos do diâmetro menor de diferentes tipos de fibra em músculo sóleo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . □ - Grupos que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CON8; ■ - Grupos que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CON16; ○ - Grupos que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo GO; \$ - Grupos que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo GWP; ● - Grupos que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo GDC20; ★ - Grupos que apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo GDC60. Significância estatística de 95%,  $p < 0,05$ .

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo geral analisar e quantificar os efeitos de diferentes magnitudes de restrição calórica, com ou sem suplementação de proteína animal, sobre o trofismo e a distribuição de fibras do músculo sóleo em ratos obesos sem treinamento. Os resultados demonstraram que a obesidade induzida promove alterações significativas na morfologia muscular, atuando principalmente na redução no número de fibras oxidativas tipo I

(FTI) e aumento no diâmetro das fibras, possivelmente associado ao acúmulo de lipídios intracelulares.

De forma geral, todas as intervenções dietéticas aplicadas se mostraram eficazes em atenuar essas alterações, indicando uma resposta positiva frente aos impactos negativos no tecido muscular esquelético impostos pela obesidade. Por outro lado, o grupo em restrição calórica de maior magnitude (60%), mostrou drástica redução em diâmetro, podendo significar perda de conteúdo muscular. Notavelmente, a suplementação com proteína animal associada à restrição calórica de 60% (GWP) mostrou-se eficaz na preservação do trofismo das fibras, demonstrando um efeito protetor contra a degradação da massa muscular durante a restrição energética. Esses achados corroboram evidências da literatura que associam um maior aporte proteico à atenuação da perda muscular em situações de déficit calórico. Além disso, intervenções de menor intensidade, como a reeducação alimentar e a restrição de menor magnitude, também resultaram em melhorias na morfologia muscular, reforçando que ajustes alimentares, mesmo que sutis, são capazes de gerar efeitos positivos sobre o músculo esquelético, em um contexto obesogênico. Contudo, como já mencionado, existem situações clínicas ou até mesmo esportivas que demandam a necessidade de rápida perda de peso, necessitando a aplicação de protocolos de emagrecimento mais severos.

Dessa forma, conclui-se que a modulação da dieta, tanto pelo estabelecimento de uma restrição calórica mais branda quanto pela suplementação de proteína aplicada em uma restrição mais intensa, exerceu papel essencial na preservação das características musculares em animais obesos, quando submetidos à restrição calórica, representando uma estratégia relevante na prevenção ou atenuação da perda de massa magra no processo de emagrecimento, mesmo na ausência de exercício físico.

## REFERÊNCIAS

- AKHMEDOV, D., & BERDEAUX, R. Os efeitos da obesidade na regeneração do músculo esquelético. *Frontiers in Physiology*.2013
- ALGHAMDI, B. S. The Effect of Melatonin and Exercise on Social Isolation-Related Behavioral Changes in Aged Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*. February. Volume 14. 2022.
- AMELY M, VERREIJEN, MARIELLE, F. ENGBERINK, R. G. MEMELINK, SUZANNE, E. VAN DER PLAS, MARJOLEIN VISSERAND PETER, J.M. Weijjs. Effect of a high protein diet and/or resistance exercise on the preservation of fat free mass during weight loss in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal* 16:10. 2017
- ANTHONY, T. G; McDANIEL, B. J. M; KNOLL, P; BUNPO, P; PAUL, G. L; McNURLAN, M. A. Feeding Meals Containing Soy or Whey Protein after Exercise Stimulates Protein Synthesis and Translation Initiation in the Skeletal Muscle of Male Rats. *The Journal of Nutrition*. 137: 357–362. (2007)
- ANYIAM, O. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Caloric Restriction on Skeletal Muscle Mass in Individuals with, and without, Type 2 Diabetes. *Nutrients*, Basel, v. 16, n. 19, p. 3328, 2024.
- APOVIAN, C. M. Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *AJMC*. Volume 22. Issue 7 Suppl. Jun 2, 2016.
- BERRAZAGA, I; MICARD, V; GUEUGNEAU, M; WALRAND, S. The Role of the Anabolic Properties of Plant- versus Animal-Based Protein Sources in Supporting Muscle Mass Maintenance: A Critical Review. *Nutrients* 2019, 11, 1825. 2019
- CARMODY R. N, et al., Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota, *Cell Host Microbe* 17 (1) (2015) 72–8
- CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; MARTINEZ, E. Z.; NEDER, L.; MATTIELLOSVERZUT, A. C. Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. *Acta Histochem*, 277-282, 2011.
- CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. *Scand J Med Sci Sports*, 453-461, 2008.
- CRETTAZ, M., PRENTKI, M., ZANINETTI, D., & JEANRENAUD, B. (1980). Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *The Biochemical journal*, 186 2, 525-34.
- DAPHNNE, P.; ZHANG, W; BANSBACK, N; AMARSI, Z; BIRMINGHAM, L. C; ANIS, A.H. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC. Public Health*.9:88. 2009.

DELGADO BRAVO, M. *et al.* Alterations in skeletal muscle morphology and mechanics in juvenile male Sprague Dawley rats exposed to a high-fat high-sucrose diet. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 12013, 2023.

DRUMMOND, M. J; GLYNN, E. L; FRY, C. S; TIMMERMAN, K. L; VOLPI, E; RASMUSSEN, B. B. An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol-Endocrinol Metabol*; ;298(5): E1011-E8. 2010.

ELANGO, R; HUMAYUNA, M. A; BALL, R. O; PENCHARZA, P. B. Evidence that protein requirements have been significantly underestimated. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 13:52–57. 2010.

ELASHRY, M. I; ELDAEY, A; GLENSKE, K; MATSAKAS, A; WENISCH, S; ARNHOLD, S; PATEL, K. The effect of high-fat diet on the morphological properties of the forelimb musculature in hypertrophic myostatin null mice. *J Anat*. Oct;235(4):825- 835. 2019.

FELGINES, C; SAVANOVITCH, C; FARGES, M. C; CYNOBER, L; VASSON, M. P. Protein Metabolism in Rats During Long-Term Dietary Restriction: Influence of Aging. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. Vol. 23. 1999.

FURINO, O. V. Modulação de irisina, composição corporal, e parâmetros metabólicos em ratos wistar obesos exógenos frente ao protocolo de treinamento aeróbico e/ ou intervenção dietética. UFSCar. Tese de doutorado. 2021.

GERRITS, M. *et al.* Reduced skeletal muscle oxidative capacity and increased muscle lipid accumulation in human obesity. *Obesity*, v. 18, n. 8, p. 1450–1456, 2010.

GOODPASTER, B. H. *et al.* Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 49, n. 4, p. 467–472, 2000.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. *Histologia*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 508.

HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D. E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, v. 50, n. 4, p. 817–823, 2001.

HEYMSFIELD SB, YANG S, MCCARTHY C, BROWN JB, MARTIN CK, REDMAN LM, RAVUSSIN E, SHEN W, MÜLLER MJ, BOSY-WESTPHAL A. Proportion of caloric restriction-induced weight loss as skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)*. 2024 Jan;32(1):32-40.

HOLMÄNG, A., BRZEZINSKA, Z., & BJORNTORP, P. (1993). Effects of hyperinsulinemia on muscle fiber composition and capillarization in rats. *Diabetes*, 42(7), 1073–1081.

HOTAMISLIGIL, G. S; MURRAY, D.L; CHOY, L. N; SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4854–58. 1994.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos; CARNEIRO, José. *Histologia básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

- KHAN, I. M; et al. Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*.39(11):1607–1618. 2015.
- KIM, J. Y. Optimal diet strategies for weight loss and weight loss maintenance. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, v. 30, n. 1, p. 20–31, 2021.
- KLATSKY, A., ZHANG, J., UDALTSOVA, N., LI, Y., & TRAN, N. (2017). Índice de Massa Corporal e Mortalidade em uma Coorte Muito Grande: É Realmente Mais Saudável Estar Acima do Peso?. *The Permanente Journal* , 21, 16-142.
- KRIEGER, J; SITREN, H; DANIELS, M; LANGKAMP-HENKEN, B. Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction: a metaregression. *Am J Clin Nutr* 83:260–74. 2006.
- LEE, SY; GALLAGHER, D. Assessment methods in human body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 11(5):566–572.8. 2008.
- LEITE, LUCIA & ROCHA, ÉRIKA & BRANDÃO-NETO, JOSÉ. (2010). Obesidade: uma doença inflamatória.
- LI, J., ZHANG, Z., BO, H., & ZHANG, Y. (2024). Exercise couples mitochondrial function with skeletal muscle fiber type via ROS-mediated epigenetic modification.. *Free radical biology & medicine*, 213, 409-425
- LIM, K; MURAKAMI, E; LEE, S; SHIMOMURA, Y; SUZUKI, M. Effects of intermittent FoodRestriction and Refeeding on Energy Efficiency and Body Fat Deposition in Sedentary and Exercised Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 42, 449-468, 1996.
- LISS, C; LITWAK, K; TILFORD, D; REINHARDT, V. Comfortable Quarters for laboratory animals. *Animal Welfare Institute*. Tenth Edition, 2015.
- LIZUKA, K; MACHIDA, T; HIRAFUJI, M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *PharmacolSci*. 125 (2): 125-31. 2014.
- MAGKOS, F. The role of dietary protein in obesity. *Reviews in Endocrine and MetabolicDisorders*. Ago. 2020.
- MARGOLIS, L. M; RIVAS, D. A; BERRONE, M; EZZYAT, Y; YOUNG, A. J; McCLUNG, J.P; FIELDING, R. A; PASIAKOS, S. M. Prolonged Calorie restriction Down regulates Skeletal Muscle Mtorc1 Signaling Independent of Dietary Protein Intake and Associated microRNA Expression. *Frontiers in Physiology*. Oct. 2016.
- MATSAKAS, A; ROMANELLO, V; SARTORI, R; MASIERO, E; MACHARIA, R; OTTO, A;et al. Food restriction reverses the hyper-muscular phenotype and force generation capacity deficit of the myostatin null mouse. *International journal of sports medicine*;34(3):223–31. 2013.
- MCCARTHY, D.; BERG, A. Weight loss strategies and the risk of skeletal muscle mass loss. *Nutrients*, v. 13, n. 7, p. 2473, 2021.
- MEDRADES, J. P. Obesidade e inflamação: o que acontece no tecido adiposo. *Revista Blog do Profissão Biotec*, v.9, 2022..

MICHAELA, C; DEVRIES, M; PHILLIPS, S. M. Supplemental Protein in Support of Muscle Mass and Health: Advantage Whey. *Journal of Food Science* Vol. 80, S1, 2015.

MO, Xiaoxing et al. *High-fat diet induces sarcopenic obesity in natural aging rats through the gut–trimethylamine N-oxide–muscle axis*. *Journal of Advanced Research*, v. 70, p. 405–422, 2025.

MOST, J; REDMAN, L. M. Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans. *Experimental Gerontology*. Vol133, Maio. 2020.

NANA, A; SLATER, GJ; HOPKINS WG et al. Effects of daily activities on dual-energy X-ray absorptiometry measurements of body composition in active people. *Med Sci Sports Exerc*. 44(1):180–189. 2012.

NILSON EAF, GIANICCHI B, FERRARI G, REZENDE LFM. The projected burden of non-communicable diseases attributable to overweight in Brazil from 2021 to 2030. *Sci Rep*. 2022 Dec 28;12.

NORTON, C. et al. Protein Supplementation at Breakfast and Lunch for 24 Weeks beyond Habitual Intakes Increases Whole-Body Lean Tissue Mass in Healthy Older Adults. *J. Nutr*, v. 146, p. 65–69, 2016.

PASIAKOS, S. M. et al. Effects of high-protein diets on fat-free mass and muscle protein synthesis following weight loss: a randomized controlled trial. *FASEB J*, v. 27, p. 3837–3847, 2013.

PEDERSEN, B. K; FEBBRARIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 8(8):457–465. 2012.

PEDROSA, R. G; TIRAPUGUI, J; ROGERO, M. M; CASTRO, I. A; PIRES, I. S. O. P; OLIVEIRA, A. A. M. Influência do exercício físico na composição química da massa corporal magra de ratos submetidos à restrição alimentar. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 40, n. 1, jan./mar.2004.

PHILLIPS, B. E.; HILL, D. S.; ATHERTON, P. J. Regulation of muscle protein synthesis in humans. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 15, n. 1, p. 58–63, 2012

PLOTKIN, D., ROBERTS, M., HAUN, C., & SCHOENFELD, B. (2021). Transições de Tipos de Fibras Musculares com Treinamento Físico: Mudanças de Perspectivas. *Esportes*

PRATESI, A; TARANTINI, F; DI BARI, M. Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 10(1): 11-14. 2013.

ROTHNEY, MP; BRYCHTA, RJ; SCHAEFER EV et al. Body composition measured by dual-energy X-ray absorptiometry half-body scans in obese adults. *Obesity* ; 17(6):1281–1286. 2009.

SALAZAR, S. S. Assessment and Management of the Obese Adult Female: A Clinical Update for Providers. *J Midwifery Womens Health*. 2006.

SIMONEAU, J. A. et al. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB Journal*, v. 13, n. 14, p. 2051–2060, 1999.

SOUZA, J. M. B; I; CASTRO, M. M; MAIA, E. M. C; RIBEIRO, A. N; ALMONDES, K. M; SILVA, N. G. Obesidade e tratamento: desafio comportamental e social. Revista brasileira de terapias cognitivas. Rio de Janeiro. Jun, 2005.

STOMBERG, E. G; CAO, J. J; LIN, G. G; WULFF, C. R; MURPHY, N. E; YOUNG, A. J; McCLUNG, J. P; PASIAKOS, S. M. Dietary Protein Level and Source Differentially Affect Bone Metabolism, Strength, and Intestinal Calcium Transporter Expression during Ad Libitum and Food-Restricted Conditions in Male Rats. The Journal of Nutrition. April. 2014.

SUTHAM, W., SRIPETCHWANDEE, J., MINTA, W., MANTOR, D., PATTANAKUHAR, S., PALEE, S., PRATCHAYASAKUL, W., CHATTIPAKORN, N., & CHATTIPAKORN, S. (2018). Ovariectomy and obesity have equal impact in causing mitochondrial dysfunction and impaired skeletal muscle contraction in rats. *Menopause*, 25, 1448–1458.

TALLIS, J., JAMES, R., & SEEBACHER, F. (2018). Os efeitos da obesidade na função contrátil do músculo esquelético. *Journal of Experimental Biology*, 221.

TURNER, P. V; BRABB, T; PEKOW, C; VASBINDER, M. A. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 50, Pages 600–613. 2011.

WANDERLEY, E. N; FERREIRA, V. A. Obesidade: Uma perspectiva plural. *Ciência e saúde coletiva*. 15 (1), 2010.

WILLIAMS, E. P; MESIDOR, M; WINTERS, K; DUBBERT, P. M; WYATT, S. B. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current obesity reports*. Jun. 2015.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 1, p. 43–54, 3 jan. 2017.

YOSHIHARA, T., NATSUME, T., TSUZUKI, T., CHANG, S., KAKIGI, R., MACHIDA, S., SUGIURA, T., & NAITO, H. (2021). Long-term physical inactivity exacerbates hindlimb unloading-induced muscle atrophy in young rat soleus muscle. *Journal of applied physiology*.