



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

THAYSA DE OLIVEIRA LIMA SOUZA MENEZES

**REPERCUSSÕES DA DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE O PERÍODO
CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA
DE FATORES REGULADORES DA MIOGÊNESE E DE PROTEÍNAS
CONTRÁTEIS DE RATOS**

Recife

2017

THAYSA DE OLIVEIRA LIMA SOUZA MENEZES

**REPERCUSSÕES DA DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE O PERÍODO
CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA
DE FATORES REGULADORES DA MIOGÊNESE E DE PROTEÍNAS
CONTRÁTEIS DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Título de Doutor em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dra. Karla Mônica Ferraz
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Elisa Toscano.

RECIFE

2017

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4 -1895

M541r Menezes, Thaysa de Oliveira Lima Souza.
Repercussões da dieta hiperlipídica durante o período crítico de desenvolvimento sobre a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e de proteínas contráteis de ratos / Thaysa de Oliveira Lima Souza Menezes. – Recife: o autor, 2017.
127 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Karla Mônica Ferraz.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em nutrição.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Músculo esquelético. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Genes. I. Ferraz, Karla Mônica (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018-17)

Thaysa de Oliveira Lima Souza Menezes

Repercussões da dieta hiperlipídica durante o período crítico de desenvolvimento sobre a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e de proteínas contráteis de ratos

Tese aprovada em 13 de setembro de 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr.^a Karla Mônica Ferraz

Prof. Dr.^a Rhowena Jane Matos Barbosa

Prof. Dr.^a Raquel da Silva Aragão

Prof. Dr.^a Ângela Amâncio dos Santos

Prof. Dr.^a Wilson Viana Castro Melo

Recife, 2017

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo amor infinito.

Aos meus pais, *Flávio de Souza* e *Adalgisa M^a de Oliveira Lima*, que me deram o alicerce da vida e me ensinaram as lições que não estão nos livros.

Ao meu esposo, *Julian Menezes*, pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por todas as oportunidades que tem dado à minha vida, por me suprir em todas as necessidades, pela força interior para superar as dificuldades, por mostrar o caminho nas horas incertas. Meu refúgio e fortaleza. Obrigada, Pai, pelo que Tu és em minha vida!

Aos meus pais, *Flávio e Adalgisa*, responsáveis pela formação de meus valores e caráter. Obrigada pelo incondicional esforço e dedicação para o meu crescimento pessoal e profissional. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

À minha tia e segunda mãe, *Severina*, a qual amo muito, por me ensinar dia-a-dia a lições de sua vida. Minha mãe Duca, hoje eu olho ao redor e vejo que temos os maiores tesouros. Cada dia de sua vida é um presente para mim.

Ao meu esposo, *Julian*, pelo que é para mim e por tudo que estamos aprendendo a ser juntos.

Ao meu irmão, *Igor*, por estar sempre na torcida pelos caminhos que escolhi para mim.

Aos meus grandes e sempre pequenos, *Artur Henrique e Ana Carolina*, por me ensinarem o amor puro.

Ao casal, *Raquel e Antônio*, pela presença, por não me permitirem esquecer de que mesmo em momentos difíceis e controversos, a perseverança alcança seus frutos.

Às amigas sempre presentes, *Rebecca e Renalli*, por acreditarem na minha capacidade, por todo carinho e amparo.

Às companheiras que a vida me trouxe, *Andresa, Aninha, Ju, Manu, Mônica, Nanda, Tati*, pela leveza do dia-a-dia, pelo apoio e torcida.

À professora *Rhowena*, por segurar minha mão, por me fazer não desistir e lutar junto comigo pela concretização deste projeto. Desejo todo o bem que você precisa e flores no seu caminho.

À professora *Karla*, pelas lições que tivemos que aprender juntas. Hoje chegamos até aqui, colhemos as pedras do caminho e pudemos construir um castelo!

À professora *Ana Elisa*, pelo material disponibilizado.

Aos parceiros de pesquisa, *Wilson, Tercya, Maria Cláudia, Jéssica*, por estarem sempre dispostos a ajudar. Muito sucesso para vocês!

Ao Sr. *França*, pela atenção e auxílio no cuidado com os animais.

Às funcionárias da pós-graduação, *Neci* e *Cecília* pela atenção e auxílio.

Aos meus pacientes pelas lições de vida que me ensinam no dia-a-dia.

Agradeço a toda minha família e aos meus amigos pela torcida, incentivos e orações. Obrigada por acreditaram nos meus sonhos. Isso é amor!

*‘Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por
isso estamos alegres.’*

(Salmos 126:3)

RESUMO

Desordens nutricionais maternas e neonatais modificam a programação de mecanismos relacionados ao controle do crescimento e desenvolvimento de fibras musculares esqueléticas. Sob o conceito de programação fetal, afirma-se que esse tecido é capaz de adaptar o seu metabolismo em resposta à ingestão de nutrientes e a variação da expressão de genes de proteínas estruturais relacionadas à função contrátil e metabólica. Além disso, a expressão gênica dos fatores reguladores do processo de miogênese, como MyoD e miogenina, pode ser alterado por uma má nutrição materna na fase neonatal. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre a evolução ponderal, resposta glicêmica, perfil lipídico e expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e proteínas contráteis nos músculos sóleo e EDL (extensor longo dos dedos) dos filhotes. Foram avaliados 81 ratos machos *Wistar*, alocados em grupos de acordo com a dieta materna recebida: Controle (C, n=46) e HFD (*high-fat diet*, H, 46% de gordura, n=35). Ao desmame, aos 90 e 180 dias, os animais do grupo H apresentaram menor peso. A dieta não produziu alterações bioquímicas no soro ou no teste de tolerância à glicose. No músculo sóleo ao desmame, houve diminuição em aproximadamente 39% na expressão do RNAm do MyoD, 30% do RNAm da actina, 15% da expressão gênica da miosina I e de cerca de 57% na expressão do gene miosina IIa. Não houve modificações na expressão gênica do EDL. Aos 90 dias, filhotes de mães HFD apresentaram aumento na expressão gênica das miosinas I (158%) e IIa (198%) no sóleo. No EDL os genes actina e miosina I apresentaram-se com menor expressão, com diminuição de 51% e 56%, respectivamente. Aos 180 dias, houve aumento nos níveis de expressão gênica da actina (125%), miosinas I (41,17%) e IIa (129%) no sóleo. No EDL, houve uma diminuição de 36% na expressão gênica da miosina IIb. Para a expressão gênica, H exibiu diferente perfil no sóleo e EDL. Em curto prazo, HFD diminuiu RNAm no sóleo, houve atraso no desenvolvimento muscular. As mudanças em longo prazo na expressão gênica revelaram aumento da capacidade contrátil e oxidativa global dos músculos. 90 dias foi considerada uma idade importante para o estabelecimento desse perfil. A HFD materna causou *imprinting* metabólico nos filhotes. Em longo prazo, houve remodelação no nível de RNAm de proteínas contráteis e relacionadas ao metabolismo do músculo, que traduz o potencial de adaptação metabólica desse tecido e pode ser início de um distúrbio metabólico. A modificação na expressão dos genes pode ter ocorrido para garantir a continuidade do desenvolvimento, visando um fenótipo funcional do músculo.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Dieta hiperlipídica. Genes. Período crítico do desenvolvimento. Fatores reguladores da miogênese.

ABSTRACT

Maternal and neonatal nutritional disorders modify the programming of mechanisms related to the control of growth and development of skeletal muscle fibers. Under the concept of fetal programming, it is stated that this tissue is able to adapt its metabolism in response to nutrient intake and variation in the expression of structural protein genes related to contractile and metabolic function. In addition, the gene expression of the regulatory factors of the myogenesis process, such as MyoD and myogenin, can be altered by maternal malnutrition in the neonatal phase. The objective of this study was to evaluate the effects of the hyperlipidic diet during gestation and lactation on the ponderal evolution, glycemic response, lipid profile and gene expression of myogenic regulatory factory and contractile proteins in the soleus and EDL (*longus extensor digitorum*) muscles of puppies. A total of 81 male Wistar rats were allocated to groups according to the received maternal diet: Control (C, n = 46) and HFD (high fat diet, H, 46% fat, n = 35). At weaning, at 90 and 180 days, the animals in group H presented lower weight. The diet did not produce serum biochemical changes or the glucose tolerance test. In the soleus muscle at weaning, there was a 39% decrease in MyoD mRNA expression, 30% of actin mRNA, 15% of myosin I gene expression and 57% in myosin IIa gene expression. There were no changes in the EDL gene expression. At 90 days, pups of HFD mothers showed an increase in the gene expression of myosin I (158%) and IIa (198%) in the soleus. In EDL, the actin and myosin I genes presented lower expression. At 180 days, there was an increase in the levels of actin gene expression (125%), myosin I (41,17%) and IIa (129%) in the soleus. In EDL, there was only a decrease in the gene expression of myosin IIb. For gene expression, H exhibited a different profile in the soleus and EDL. In short term, HFD decreased mRNA in the soleus, there was delay in muscle development. The long-term changes in gene expression revealed an increase in the overall contractile and oxidative capacity of the muscles. 90 days was considered an important age for establishing this profile. Maternal HFD caused metabolic imprinting in pups. In the long term, there was remodeling at the level of mRNA of contractile proteins and related to muscle metabolism, which translates the potential of metabolic adaptation of this tissue and may be the beginning of a metabolic disorder. Modification in gene expression may have occurred to ensure continuity of development, targeting a functional muscle phenotype.

Keywords: Skeletal muscle. Diet Hight-fat. Genes. Critical period of development. Myogenic regulatory factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Etapas da miogênese	p.18
Figura 2.	Esquema simplificado das vias e dos fatores de regulação da miogênese	p.19
Figura 3.	Peso corporal na gestação	p.43
Figura 4.	Peso corporal, ganho de peso da prole durante a lactação	p.44
Figura 5.	Peso corporal, ganho de peso da prole de ratos pós-desmame	p.45
Figura 6.	Resposta glicêmica ao teste de tolerância à glicose aos 70 (A, C) e 150 dias (B, D).	p.47
Figura 7.	Expressão gênica de fatores miogênicos e proteínas contráteis no sóleo e EDL aos 22 dias	p.49
Figura 8.	Expressão gênica das proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 90 dias	p.50
Figura 9.	Expressão gênica das proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 180 dias	p.51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Português	Inglês
C	Grupo Controle	Control Group
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis	Chronic non-communicable diseases
DOHaD	Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença	Developmental Origin of Health and disease
EDL	Extensor longo dos dedos	<i>Longus extensor digitorum</i>
GPC	Ganho de peso corporal	Body weight gain
H	Grupo hiperlipídico	Hiperlipidic group
HFD	Dieta hiperlipídica	High-fat Diet
IGF	Fator de crescimento insulínico	Insulin-Like Growth Factor
IGFBP-4	-	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
MHC	Cadeia pesada de miosina	Miosin heavy chain
MRFs	Fatores reguladores da miogênese	Myogenic regulatory factors;
Myf-5	-	Myogenic factor 5
NPY	Neuropeptídeo Y	Neuropeptide Y
TNF- α	Fator de necrose tumoral α	Tumor necrosis factor α
TTG	Teste de tolerância à glicose	Glucose tolerance test
PCR	Reação em Cadeia Polimerase	Polymerase chain reaction

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição centesimal das dietas experimentais	39
Tabela 2.	Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação	40
Tabela 3.	Parâmetros bioquímicos do soro da prole submetida à HFD durante a gestação e lactação	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Miogênese.....	18
1.2	Fibra Muscular: desenvolvimento e características.....	24
2.3	Período crítico do desenvolvimento, nutrição e músculo esquelético.....	27
3	HIPÓTESES	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo Geral	37
4.2	Objetivos Específicos	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Animais e condições experimentais.....	38
5.2	Grupos Experimentais	38
5.3	Parâmetros Somáticos	39
5.4	Teste de tolerância à glicose	40
5.5	Coleta de amostras.....	40
5.6	Análise bioquímica do soro.....	40
5.7	Análise da expressão gênica através do PCR em tempo real	41
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
7	RESULTADOS	44
7.1	Evolução ponderal dos animais na gestação.....	44
7.2	Evolução ponderal da prole na lactação.....	46
7.3	Perfil bioquímicos do soro	47

7.4	Tolerância à glicose pós-lactação.....	47
7.5	Expressão gênica de fatores miogênicos e proteínas do sóleo e EDL de filhotes aos 22 dias.....	49
7.6	Expressão gênica de proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 90 dias.....	50
7.7	Expressão gênica de proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 180 dias.....	51
8	DISCUSSÃO.....	53
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICES.....	78
	APENDICE A – Artigo Original 1: <i>Effects of a maternal High-Fat Diet on expression of genes controlling Skeletal Muscle Development and contraction protein in weaning rat offspring.....</i>	79
	APÊNDICE B – Artigo Original 2: <i>Long- term transcriptional responses in rat skeletal muscle to a High-Fat Diet during gestation and lactation</i>	100
	ANEXOS.....	122
	ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	123
	ANEXO II – Análise de Composição centesimal da dieta hiperlipídica	124
	ANEXO III – Comprovante de submissão Artigo 1	125
	ANEXO IV – Comprovante de submissão Artigo 2	126

1 INTRODUÇÃO

O período crítico de desenvolvimento é definido como o período em que há rápida proliferação e diferenciação celular, em que órgãos e tecidos estão mais suscetíveis a injúrias e podem sofrer alterações permanentes na estrutura e função (DOBBING, 1965). O padrão dos eventos celulares pode ser modificado com consequências deletérias para a aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo (NOBACK e EISENMAN, 1981). Os períodos críticos para o desenvolvimento de roedores correspondem à gestação e lactação (DOBBING, 1965; MORGANE *et al.*, 2002).

Reforçando essa ideia de que agressões sofridas na vida precoce podem estar relacionadas às alterações morfológicas e fisiológicas na vida adulta, foi descrito o fenômeno da plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 1989). Esse fenômeno denota a capacidade que o organismo tem de expressar diferentes fenótipos de acordo com o ambiente (GLUCKMAN *et al.*, 2005). De acordo com esse conceito, um genótipo responde às condições ambientais em sua morfologia sua morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento (WEST-EBERHARD, 1989). Dessa forma, a plasticidade fenotípica permite ao organismo modificar sua trajetória de crescimento e desenvolvimento através de processos adaptativos (GLUCKMAN *et al.*, 2005). Isso pode induzir efeitos permanentes sobre a estrutura e função dos órgãos, por exemplo, o músculo esquelético, e tem sido a base da área de estudo da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD) (GLUCKMAN e HANSON, 2004).

A nutrição, juntamente com o estresse, seria um dos principais indutores da plasticidade fenotípica (GLUCKMAN *et al.*, 2005). Estudos de experimentação animal relatam que a nutrição materna inadequada durante a gestação e/ ou lactação pode alterar os aspectos do desenvolvimento morfológico e fisiológico dos filhotes, aumentando a predisposição na vida adulta para doenças metabólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; GODFREY e BAKER, 2001; MORLEY e DWYER, 2001). Os efeitos da administração de uma dieta hiperlipídica no período crítico de desenvolvimento desperta particular interesse por conta do envolvimento de alterações metabólicas em diversas doenças e das repercussões na vida adulta

(BAYOL, 2005; ESTADELLA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que o consumo desse tipo de dieta na gestação e lactação está relacionado à expressão anormal dos neurotransmissores envolvidos na regulação da homeostase energética (VICKERS *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2009). Além disso, a literatura relata achados de atrofia muscular ao desmame, hipoplasia de fibras, além de alterações metabólicas em ratos adultos (BAYOL, 2005). Tais relatos despertam particular interesse porque o músculo esquelético compreende uma porção substancial da massa corporal total e é essencial para a locomoção e adequação metabólica (BROOK *et al.*, 2016). Ademais, esse tecido é marcado por sua capacidade adaptativa e regenerativa em resposta ao exercício ou injúrias (LEPPER *et al.*, 2011).

Neste contexto, tem-se estudado o consumo materno de dietas hiperlipídicas durante a gestação e/ou lactação e seus efeitos sobre o crescimento muscular e fatores metabólicos do músculo (BAYOL, 2005; MIZUNOYA *et al.*, 2013). Entretanto, ainda estão sendo esclarecidos os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica de fatores moleculares relacionados ao potencial de desenvolvimento muscular e de proteínas envolvidas na função contrátil e, conseqüentemente, metabólica do músculo esquelético de ratos.

Dessa forma, faz-se necessário compreender os mecanismos envolvidos no consumo da dieta hiperlipídica durante o período crítico do desenvolvimento sobre o perfil ponderal, parâmetros bioquímicos, tolerância à glicose e expressão de genes envolvidos na miogênese e na função contrátil e metabólica de diferentes músculos. Este estudo fornecerá suporte adicional para compreender a relação entre o estado nutricional no início da vida sobre os processos de desenvolvimento do músculo esquelético, levando em consideração os efeitos da plasticidade fenotípica no processo de maturação de ratos jovens e adultos.

Portanto, a pergunta condutora que conduziu o presente estudo foi: “Quais os efeitos da dieta hiperlipídica ofertada durante o período crítico do desenvolvimento sobre a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e de proteínas contráteis do músculo esquelético de ratos?”. Diante do exposto, esta pesquisa foi desenvolvida sob a hipótese de que a exposição a uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação diminui a expressão de genes relacionados à formação e ao

desenvolvimento muscular, além de provocar respostas distintas músculo-dependentes na expressão gênica de proteínas contráteis, em curto e longo prazo. Este estudo se propõe a analisar as repercussões da ingestão materna de dieta hiperlipídica durante o período crítico sobre a expressão gênica de proteínas envolvidas na miogênese e na função contrátil do músculo esquelético da prole de ratos.

Esta tese resultou em dois artigos originais, que foram submetidos a revistas científicas para apreciação e subsequente publicação. O primeiro artigo original intitula-se “***Effects of a maternal high-fat diet on expression of genes controlling skeletal muscle development and contraction protein in weaning rat offspring***” (APÊNDICE A) e discorre sobre os efeitos em curto prazo do consumo de uma dieta hiperlipídica sobre o perfil ponderal e a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e proteínas contráteis em ratos jovens, submetido à revista *Muscle & Nerve*. O segundo artigo original intitula-se “***Long- term transcriptional responses in rat skeletal muscle to a High-Fat Diet during gestation and lactation***” (APÊNDICE B) foi submetido à revista *Life Sciences*, o qual traz informações sobre a influência em longo prazo da dieta hiperlipídica na gestação e lactação sobre a evolução ponderal, perfil glicêmico e lipídico pós-lactação e expressão gênica de proteínas envolvidas na função contrátil do músculo esquelético de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Miogênese

O músculo esquelético é um tecido complexo e heterogêneo que serve a múltiplas funções no organismo. O processo de desenvolvimento do tecido muscular – miogênese – pode ser dividido em várias fases distintas (TAJBAKSHI, 2009). Durante a miogênese embrionária, as estruturas derivadas do mesoderma geram as primeiras fibras musculares propriamente ditas do corpo e, subseqüentemente, são geradas fibras adicionais (SAMBASIVAN e TAJBAKSHI, 2007).

Os mioblastos que formam o músculo esquelético são derivados do mesoderma, das regiões dos miótomos dos somitos. O miótomo é o primeiro local no embrião onde o músculo esquelético se desenvolve (YUSUF e BRAND-SABERI, 2012) (ver figura 1). Uma elaborada interação de mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos controla a miogênese em todos os estágios de desenvolvimento. Nesse processo, Fatores reguladores intrínsecos (MRFs, do inglês *myogenic regulatory transcription factors*), denominados MyoD, Miogenina, *myogenic factor 5* (Myf-5) e MRF4, funcionam primariamente como ativadores da transcrição, ligando-se ao DNA através de sítios específicos, pelos quais controlam os eventos da miogênese (RUDNICKI e JAENISCH, 1995; YUSUF e BRAND-SABERI, 2012). O entendimento do modo de ação desses fatores leva ao esclarecimento sobre como a informação gênica pode influenciar o processo de miogênese.

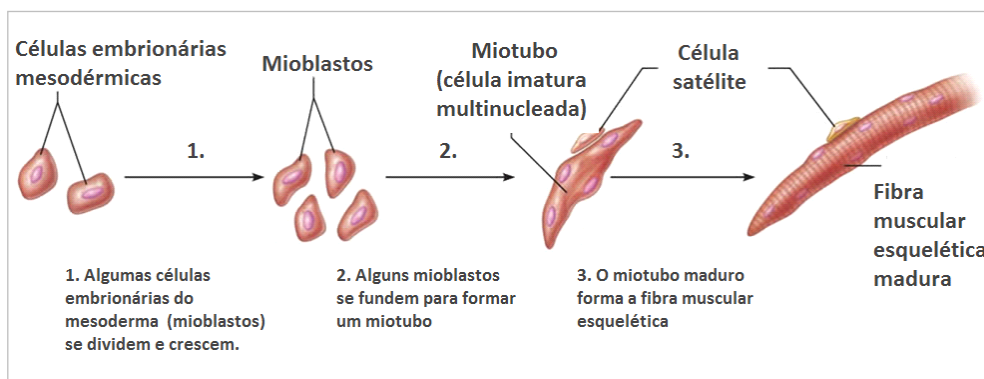


Figura 1. Etapas da miogênese. Fonte: <http://b-log-ia20.blogspot.com.br/2016/04/>

O primeiro passo da miogênese acontece nas células mesenquimais, que têm seus núcleos e corpos celulares alongados, diferenciando-se em mioblastos. Logo após, essas células primordiais se fundem para formar estruturas cilíndricas, alongadas e multinucleadas – os miotubos (Figura 1) (YUSUF e BRAND-SABERI, 2012). No aspecto molecular, esses eventos são precedidos pela ativação gênica e pela expressão dos fatores de transcrição - MyoD, Miogenina, Myf-5, MRF4 - nas células miogênicas precursoras (NABESHIMA *et al.*, 1993).

Desse modo, após a diferenciação decorrente da expressão dos fatores MyoD e Myf5, as células miogênicas primordiais são diferenciadas em mioblastos. Posteriormente, após a expressão do fator MRF-4, as células são reconhecidas como miócitos, células adultas diferenciadas que exercem plenamente as funções atribuídas às células musculares (BENTZINGER *et al.*, 2012) (Figura 2). Estas células contêm genes específicos que favorecem a tradução de proteínas que constituirão a cadeia pesada de miosina e a creatina quinase, que caracterizam os miócitos (LOWEY *et al.*, 1969).

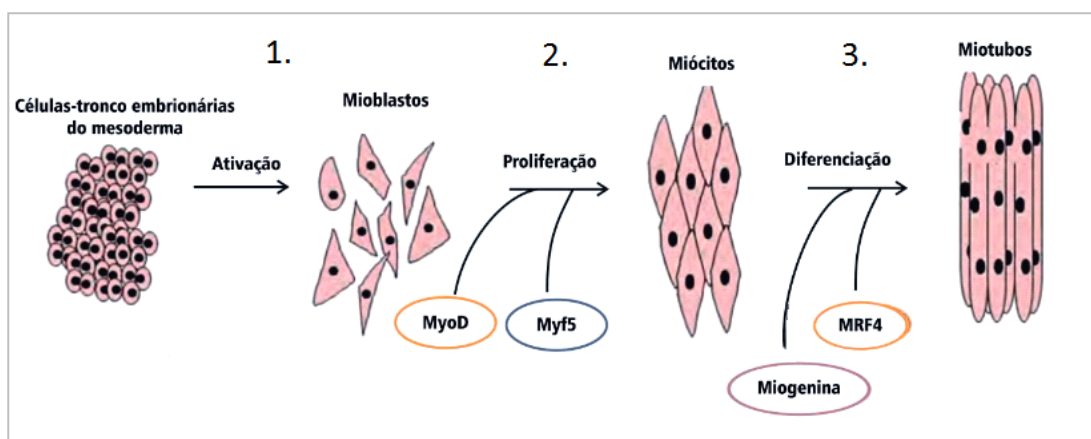


Figura 2. Esquema simplificado das vias e dos fatores de regulação da miogênese. Fonte:

http://media.wix.com/ugb/b703be_fc37f98bd814f598663469cdd512937.pdf

Os miócitos continuam processo de diferenciação durante esta fase, que culmina com a fusão entre miócitos e a formação de um sincício chamado miotubo (Figuras 1 e 2). Este, também chamado miofibrila, atinge a maturidade celular quando apresenta contratilidade, denominando-se então unidade morfofuncional do músculo esquelético (LAFUSTE, 2005).

Ao mesmo tempo em que esta maturidade muscular é atingida, uma população distinta de mioblastos não se diferencia e fica associada à superfície das fibras musculares em desenvolvimento, servindo como células fonte musculares quiescentes, as células satélites (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Estas células são células tronco pluripotentes, que estão prontas para serem diferenciadas unicamente em miócitos após serem estimuladas a se desenvolver (GROS *et al.*, 2005; BENTZINGER *et al.*, 2012). As células satélites conferem uma capacidade de crescimento pós-natal e regeneração ao músculo esquelético (SEALE *et al.*, 2001; ZAMMIT *et al.*, 2006; BENTZINGER *et al.*, 2010). Para que haja essa regeneração e/ou crescimento, o fator miogênico MyoD é requerido para a diferenciação de células satélites em mioblastos (ZHANG *et al.*, 2010), enquanto a miogenina regula a proliferação, divisão celular, fusão, crescimento e maturação, formando-se assim as fibras maduras (RYALL, 2013).

Dessa forma, o crescimento muscular durante o desenvolvimento resulta dos processos contínuos de fusão de mioblastos e miotubos (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Ademais, os miofilamentos desenvolvem-se no citoplasma dos miotubos durante ou depois da fusão dos mioblastos (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Logo depois, desenvolvem-se as miofibras e outras organelas características das células musculares estriadas. Ao se diferenciar, os miotubos tornam-se envoltos pelas lâminas externas, que os separam do tecido conjuntivo circundante (LE GRAND e RUDNICKI, 2007).

As propriedades funcionais do músculo esquelético dependem da manutenção de uma rede completa de miofibrilas, motoneurônios, vasos sanguíneos e da matriz extracelular do tecido conjuntivo (LE GRAND e RUDNICKI, 2007). Esse conjunto de estruturas, bem como a organização entre elas, é o que determina a função muscular (LE GRAND e RUDNICKI, 2007). Entretanto, para que o músculo seja funcional, durante seu processo de formação e diferenciação, é necessário a atuação de alguns fatores de crescimento, também conhecidos como somatomedinas ou fator de crescimento insulínico (IGF) (ROSENDAL *et al.*, 2002), fatores extrínsecos que regulam positiva ou negativamente a miogênese (VELLOSO, 2008).

Há dois tipos de IGF: fator I e II. Enquanto o IGF-I é atuante no período pós-natal, o IGF-II é encontrado na fase intra-útero e pós-natal imediata em lugares específicos do cérebro, p. ex. hipocampo (HAWKES e KAR, 2004). O IGF-I e seus componentes agem como um hormônio polipeptídico pertinente ao anabolismo celular e exercem efeito importante sobre o crescimento somático e tecidual de muitas espécies (LEVINE *et al.*, 1949). No músculo, o IGF-I exerce papel fundamental na hipertrofia e na hiperplasia das fibras musculares, bem como em tecidos associados à sua função, como os tendões (LEVINE *et al.*, 1949). O mecanismo pelo qual o IGF-I induz à hipertrofia da fibra muscular envolve a combinação da ativação de células satélites e a síntese de proteínas nas miofibrilas (BARTON-DAVIS *et al.*, 1999), provavelmente associado à indução da miogenina (SPANGENBURG, 2004).

Além da função fundamental da MyoD e miogenina na proliferação e diferenciação de células musculares, tem sido sugerido que tais fatores de regulação desempenhem outras funções, pois sua expressão persiste mesmo após as fases pós-mitóticas em músculos maduros (HUGHES *et al.*, 1993). De fato, a literatura relata que MyoD e miogenina podem estar envolvidos no estabelecimento e manutenção da fibra muscular de fenótipo lento e rápido (WILLOUGHBY e NELSON, 2002; AGUIAR *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013). Nesse sentido, há registros de que os RNAs de MyoD e miogenina se acumulam seletivamente em músculos posteriores de ratos adultos que diferem em suas características contráteis (HUGHES *et al.*, 1993). Dessa forma, manipulações que alterem o fenótipo do músculo seriam acompanhadas de alterações correspondentes nas transcrições de MyoD e Miogenina (HUGHES *et al.*, 1993; ANDREWS *et al.*, 2010).

Assim, para testar a relação causal entre o fenótipo muscular e os níveis e RNAm de MyoD e miogenina, autores propuseram diferentes modelos para induzir transformação do tipo de fibra do músculo sóleo: reinervação cruzada do sóleo por um nervo de músculo rápido e tratamento com hormônio tireoidiano (T3), conhecido por ativar a expressão gênica das miosinas rápidas (HUGHES *et al.*, 1993). Os resultados desse experimento são condizentes com uma diminuição da expressão gênica da miogenina no músculo reinervado, que está de acordo com a mudança no padrão de expressão de genes do sóleo para um músculo rápido (HUGHES *et al.*, 1993). Após a manipulação hormonal, houve ativação dos genes das isoformas

rápidas da cadeia pesada de miosina (*myosin heavy chain, MHC*) (IZUMO *et al.*, 1986; GUSTAFSON *et al.*, 1986), aumento do nível de expressão do RNAm do MyoD e diminuição do nível de RNAm da miogenina (HUGHES *et al.*, 1993).

Em concordância com os estudos anteriores, observou-se que há uma correlação positiva entre o aumento de MyoD e miogenina e a expressão gênica das *MHCs*, relacionadas ao tipo de fibra muscular (WILLOUGHBY e NELSON, 2002). De fato, Zhu e colaboradores (2013) sugerem que a expressão da miogenina no tecido muscular maduro esteja presente especialmente em músculo com metabolismo oxidativo. Cabeço e cols. (2012) confirmaram que a miogenina, quando comparada com MyoD, é expressa em níveis elevados em músculos de fibras lentas; enquanto o oposto é verdadeiro para músculos de contração rápida. Isto é, há maior quantidade de miogenina em músculos de contração lenta e de MyoD em músculos de contração rápida (HUGHES *et al.*, 1993; AGUIAR *et al.*, 2013). Assim, os genes que codificam a MyoD e miogenina exibem diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento do músculo quando a expressão da isoforma é modificada (HUGHES *et al.*, 1993). Entretanto, os dados da literatura não determinam se as mudanças na expressão de MyoD e miogenina precedem ou simplesmente ocorrem em paralelo a reorganização das *MHCs* (HUGHES *et al.*, 1993).

Além disso, tais fatores reguladores têm sido relatados como marcadores para proliferação e diferenciação de células miogênicas associadas à hipertrofia muscular (HADDAD e ADAMS, 2002; PSILANDER, DAMSGAARD, PILEGAARD, 2003). De fato, o aumento da expressão gênica de MyoD e miogenina foi registrado como resposta ao treino resistido, tanto em humanos (BICKEL *et al.*, 2005) como em animais (TAMAKI *et al.*, 2000). E as respostas miogênicas evidenciaram uma capacidade de regeneração reduzida de ratos idosos em comparação aos ratos jovens (MARSH *et al.*, 1997; TAMAKI *et al.*, 2000). Há registros de aumento (100-400%) da expressão de RNAm de MyoD e miogenina após exercício resistido, desempenhando um papel importante na hipertrofia muscular (PSILANDER, DAMSGAARD, PILEGAARD, 2003), mediada pela ativação das células satélites (CHARGE e RUDNICKI, 2004). Sendo assim, considera-se que a proliferação, diferenciação e fusão de células satélites nas fibras musculares pré-existentes são necessárias para crescimento e regeneração muscular (CHARGE e RUDNICKI,

2004). Ademais, é razoável assumir que MyoD e miogenina estão envolvidos nos processos tanto de hipertrofia como hiperplasia muscular, pois o aumento dos níveis desses genes estão associados ao aumento de massa muscular (MARSH *et al.*, 1997; AGUIAR *et al.*, 2013). Por outro lado, encontram-se diminuídos em distrofias musculares, no envelhecimento ou em condições de atrofia muscular (TAMAKI *et al.*, 2000; MOTOHASHI e ASAKURE, 2014; JOUNG *et al.*, 2014).

A miogênese pós-natal é reconhecida por uma extensa hipertrofia das fibras musculares, com aumento concomitante do número de núcleos (OERTEL, 1988). Ocorre ativação contínua das células satélites em novos mionúcleos (VERDIJK *et al.*, 2014). A fusão desses núcleos e a incorporação em fibras musculares preexistentes permitem a essas fibras sintetizar mais proteínas para formar miofibrilas adicionais (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2008). Por si só, esse processo não cria novas fibras musculares, porém contribui diretamente para a hipertrofia muscular e pode estimular a transformação das fibras existentes de um tipo para outro (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2008).

No que se refere à função muscular, verificou-se que o RNAm das proteínas estruturais desse tecido – actina e miosina – começa a ser expresso na etapa da formação do miotubo (NICOLAS *et al.*, 1996). Os mioblastos aumentam sua proliferação e capacidade de migração assim como aumentam a expressão dessas proteínas (NICOLAS *et al.*, 1996). Além disso, MyoD e miogenina estão presentes no momento da ativação dos genes actina e miosina (GUNNING *et al.*, 2001). As modificações na expressão desses genes ocorrem em roedores no período pós-natal, no desenvolvimento do músculo, durante o tempo em que há amadurecimento da inervação, crescimento, remodelação do tecido muscular (HUGHES *et al.*, 1993; AGUIAR *et al.*, 2013). Ademais, a expressão da α - actina no músculo esquelético durante a diferenciação do mioblasto é também dependente dos níveis de cálcio extracelular (SPANGENBURG, 2004). Assim, o processo de diferenciação muscular é caracterizado pela indução de genes estruturais que codificam proteínas contráteis estruturais e a repressão de isoformas “*nonmuscle*” dessas famílias de genes (GUNNING *et al.*, 2001).

A indução dessas proteínas contráteis dirige a montagem da estrutura do sarcômero e permite a contração das células musculares. Tais proteínas contráteis

se acumulam em proporções fixas que reflete uma relação física no sarcômero (DEVLIN e EMERSON, 1978 apud GUNNING *et al.*, 2001). De fato, a α - actina é o principal componente proteico dos filamentos finos no músculo esquelético adulto e é fundamental para a manutenção do citoesqueleto e contração muscular. As interações entre α - actina – principal isoforma de actina do musculo esquelético adulto - e as várias miosinas em diferentes tipos de fibra muscular geram a força da contração muscular (LAING *et al.*, 2009).

2.2 Fibra muscular: desenvolvimento e características

As fibras musculares, presentes ao nascimento, diferenciam-se em músculos estriados esqueléticos devido às suas propriedades histológicas, histoquímicas e fisiológicas, isto é, segundo suas características moleculares, metabólicas, estruturais e contráteis (PETTE e SARON, 2001). Uma associação entre os estudos mecânicos e histológicos permite definir três grandes famílias de músculos: músculos ditos lentos, caracterizados pela cadeia pesada de miosina do tipo *MHCI*, constituídos por uma maior proporção de fibras tipo I com grande resistência à fadiga e utilizados para a manutenção postural; músculos rápidos, pouco resistentes à fadiga, constituídos em sua maioria por fibras musculares do tipo II e divididos em dois subgrupos correspondentes aos dois tipos de cadeia pesada de miosina – *MHCIIa* e *MHCIIb*; músculos mistos, compostos por proporções diferentes dos tipos principais de fibra (LUCAS *et al.*, 2000).

Pesquisas ressaltam a existência de outras isoformas – *MHCIIx* - com características híbridas de modo a expressar mais de uma forma de *MHC* em diferentes combinações (LUCAS *et al.*, 2000). Por exemplo, Bottinelli *et al.* (1994) mostrou que as fibras dos músculos plantares de ratos podem exprimir as isoformas I – IIa, IIa – IIx, IIx – IIb. Esta co-expressão pode representar até 85% das fibras dos músculos plantares (DI MASO *et al.*, 2000). Tal polimorfismo pode favorecer o mecanismo de transição do perfil da fibra, quando ocorre uma modificação da demanda funcional e da condição nutricional (BALDWIN e HADAD, 2001; PETTE e SARON, 2001; BARROS *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008). Neste caso, segundo

Pette e Saron (2001), o esquema geral das transições reversíveis das isoformas de MHC são as seguintes: $MHCI \leftrightarrow MHCIIa \leftrightarrow MHCd/x \leftrightarrow MHCIIb$.

Em ratos, o desenvolvimento de fibras primárias ocorre do 14° ao 16° dia de vida fetal e fibras secundárias entre 17° e 19° de vida fetal (WILSON *et al.*, 1988). Sabe-se que no período gestacional podem ocorrer modificações que são determinantes para disposição das fibras apresentadas ao nascimento. Esta influência na especificação do tipo de fibra muscular depende da interação de fatores internos e externos (KARDON, CAMPBELL e TABIN, 2002). A diferenciação em fibra tipo I e fibra tipo II inicia na gestação e a diferenciação nos subtipos ocorre ao longo do desenvolvimento (MALTIN *et al.*, 2001). Em roedores, o número de fibras pode variar no período pós-natal precoce (BRAMELD, 2004). A literatura estabelece que os eventos que definem as propriedades funcionais do músculo esquelético estendem-se até o final da lactação (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004). O desenvolvimento muscular pós-natal é resultado de mudanças na atividade neuromuscular, maturação do acoplamento excitação-contração, além de aumento nos níveis dos hormônios tireoidianos (IANUZZO *et al.*, 1977; PETTE e STARON, 2001; AGBULUT *et al.*, 2003). Dessa forma, o padrão de expressão das MHC pode ser alterado durante o começo da vida pós-natal (AGBULUT *et al.*, 2003).

Em ratos, as células satélites constituem cerca de 30% dos núcleos no músculo do neonato e decrescem para cerca de 4% no adulto e 2% no idoso (SNOW, 1977). O número dessas células também é dependente do tipo de fibras muscular: as fibras tipo I demonstram um conteúdo de células satélites cinco a seis vezes maior e têm a capacidade de proliferação, fusão e amadurecimento mais rápido (BARJOT *et al.*, 1998). As fibras tipo II também produzem menos mioblastos (ZAMMIT *et al.*, 2002).

As fibras musculares tipo I podem também ser classificadas de acordo com o metabolismo oxidativo, utilizam lipídios como fonte de energia. As fibras tipo IIa são oxidativas e glicolíticas, assim como o tipo IIx. O tipo IIb são glicolíticas, pois contêm estoques de glicogênio e glicose que são utilizados como combustíveis (CHOI *et al.*, 2007). O perfil do tipo de fibra muscular dita o desempenho muscular (COSTILL *et al.*, 1976 apud ZHU *et al.*, 2013) e é relevante para as doenças neuromusculares (BITMAN *et al.*, 2010), assim como para o entendimento de desordens metabólicas,

obesidade e diabetes tipo II (HE *et al.*, 2001). O músculo sóleo de ratos, aos seis dias pós- natal, é constituído predominantemente de fibras tipo IIa (HO *et al.*, 1983). Por outro lado, aos 21 dias, esta relação se inverte com predominância de fibras tipo I, que serão 70-80% da composição do músculo na vida adulta (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004). O EDL de roedores apresenta cerca de 93% de fibras tipo II indiferenciadas na primeira semana de vida, enquanto que na vida adulta vai apresentar cerca de 55% de fibras tipo IIa e 35% de fibras IIB (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004).

Assim, o polimorfismo pode ser uma característica das fibras com alto potencial adaptativo, inclusive metabólico. A transição do perfil metabólico – e, consequentemente fenotípico pode ser afetada pela condição nutricional, inervação/atividade neuromuscular, carga ou descarga mecânica, alteração no perfil hormonal, tipo de treinamento, envelhecimento (STARON *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008; GROSSET, *et al.*, 2009; THORLUND *et al.*, 2010; FOURÉ, *et al.*, 2011). Por outro lado, os mecanismos moleculares pelos quais a nutrição materna influencia o processo de desenvolvimento muscular e determina os perfis dos tipos de fibra permanecem imprecisos. Ademais, autores têm demonstrado que a gestação e lactação são os períodos mais importantes para o desenvolvimento de alterações permanentes no fenótipo muscular (BEDI *et al.*, 1982). Tais repercussões sobre o desenvolvimento estão associadas a uma reorganização estrutural e morfológica do músculo, uma vez que há uma orquestrada mudança na expressão gênica e a transição entre os tipos de fibras inclui modificações nas diferentes isoformas (PETTE e STARON, 2001).

2.3 Período crítico do desenvolvimento, nutrição e músculo esquelético

Os períodos iniciais de crescimento e desenvolvimento são conceituados como períodos críticos do desenvolvimento (DOBING, 1965; MORGANE *et al.*, 2002). Um aporte nutricional apropriado é necessário para o adequado crescimento e desenvolvimento do organismo (MORGANE *et al.*, 2002). De maneira geral, os desequilíbrios nutricionais adquirem maior gravidade quando ocorrem mais precocemente: se ocorrerem durante o período crítico do desenvolvimento, podem

alterar o padrão dos eventos celulares com consequências deletérias para a aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo (NOBACK e EISENMAN, 1981; SAYER e COOPER, 2005).

De fato, os ambientes intrauterino (gestação) e extrauterino (lactação) têm sido considerados como preditores de alterações fenotípicas com posteriores consequências na vida adulta (BARKER, 1991). Estas alterações durante o período de desenvolvimento são conhecidas como plasticidade fenotípica, definida como a capacidade de um genótipo responder as condições ambientais em sua morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento (WEST-EBERHARD, 1989; HANSON e GLUCKMAN, 2011). Assim, o organismo tem a capacidade de expressar diferentes fenótipos de acordo com o ambiente (GLUCKMAN, 2005).

Estudos de experimentação animal relatam que a nutrição materna inadequada durante a gestação e/ ou lactação pode alterar os aspectos do desenvolvimento morfológico e fisiológico dos filhotes, aumentando a predisposição na vida adulta para doenças metabólicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; GODFREY e BAKER, 2001; MORLEY e DWYER, 2001).

O período crítico do músculo esquelético envolve tanto o período de gestação quanto o período de lactação (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999). Estudos que avaliaram os efeitos de uma subnutrição em estágios precoces do desenvolvimento muscular, incluindo gestação e lactação, verificaram que o músculo esquelético sofre efeitos permanentes em longo prazo (WILSON *et al.*, 1988; OZANNE *et al.*, 2003). De fato, se um determinado estímulo ocorrer no período crítico, pode induzir alterações na miogênese, na massa muscular e na proporção de fibras musculares (BAYOL *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008; BRITO ALVES *et al.*, 2017).

Desse modo, o desenvolvimento e função do músculo esquelético podem ser alterados em função da disponibilidade de nutrientes (WILSON *et al.*, 1988; OZANNE *et al.*, 2003). BAYOL *et al.* (2004) afirmam que a subnutrição durante o período crítico pode influenciar a formação e desenvolvimento da fibra muscular, pela diminuição de genes relacionados ao processo de crescimento do músculo, como o IGF-I, IGFBP-4 (*insulin-like growth factor binding protein 4*). Além disso,

pode induzir alterações tanto na massa muscular - atrofia de fibras - quanto na proporção de fibras musculares, o que se reflete no mecanismo de funcionamento contrátil e metabólico do músculo (BARROS *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008), fazendo-o expressar diferentes fenótipos.

Nesse sentido, atualmente existem evidências de que há consequências em longo prazo da restrição proteica durante a gestação e lactação sobre as propriedades estruturais e metabólicas do músculo esquelético (CABEÇO *et al.*, 2012; DA SILVA-ARAGÃO *et al.*, 2014). Através do PCR em tempo real, Da Silva-Aragão *et al.* (2014) analisaram os níveis de expressão de genes que regulam a glicólise, oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial em ratos submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação. Os ratos desnutridos exibiram também um perfil de expressão gênica diferente em músculo lento (sóleo) e rápido (extensor longo dos dedos, EDL). Houve diferenças na densidade de fibras, com diminuição da taxa de oxidação de ácidos graxos e glicose em sóleo, mas não em EDL. Ao todo, essas alterações correspondem a um estado de deficiência energética e estão presentes em animais que ainda não apresentam sinal de obesidade ou intolerância à glicose (DA SILVA-ARAGÃO, 2014).

Recentemente, Brito-Alves e cols. (2017) analisaram a expressão do RNAm e expressão proteica de enzimas-chave da via glicolítica e oxidação de ácidos graxos de dois diferentes tipos de músculo esquelético – sóleo e EDL – de filhotes aos 30 dias e 90 dias de idade, expostos a uma dieta isocalórica e hipoproteica durante a gestação e lactação. Nesse estudo, as respostas transcricionais variaram em função da idade e do tipo de músculo estudado, o que sugere uma capacidade de otimizar o uso dos nutrientes disponíveis e uma alta plasticidade do músculo esquelético, contribuindo para a sua flexibilidade metabólica (BRITO-ALVES, *et al.* 2017).

Entende-se por flexibilidade metabólica a capacidade do músculo esquelético de adaptar sua regulação celular de utilização de combustível à oferta e demanda de nutrientes (NORMAN *et al.*, 2012). Dessa forma, tem-se a capacidade de aumentar a oxidação de gordura em caso de maior disponibilidade de ácidos graxos e de alternar entre gordura e glicose como fonte primária de combustível após uma refeição e de acordo com a demanda energética do organismo (CORPELEIJN *et al.*, 2009). Isso pode desempenhar um papel importante na regulação do peso corporal

e nos distúrbios metabólicos associados, pois o músculo esquelético compreende uma porção substancial no controle da saúde metabólica (BROOK *et al.*, 2016).

Diante desse cenário de programação e riscos de desenvolvimento de síndrome metabólica, autores têm relatado que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um problema de saúde global e uma ameaça à saúde e ao desenvolvimento humano (SCHIMIDT *et al.*, 2011). Em 2007, cerca de 72% das mortes no Brasil foram atribuídas às DCNT (doenças cardiovasculares, diabetes, doenças renais, doenças respiratórias crônicas, entre outras) (SCHIMIDT *et al.*, 2011). Conforme abordado por outra pesquisa, essas taxas acontecem em um contexto de desenvolvimento econômico e social marcado por avanços sociais importantes e pela resolução dos principais problemas de saúde pública vigentes (PAIM *et al.*, 2011).

Paralelamente, houve uma rápida transição demográfica no Brasil, que produziu uma pirâmide etária com maior peso relativo para adultos e idosos (IBGE, 2009). Um conjunto de eventos envolvendo crescimento da renda, industrialização, urbanização, maior acesso a alimentos em geral, incluindo os processados, e globalização de hábitos não saudáveis produziram uma rápida transição nutricional, expondo a população cada vez mais ao risco de doenças crônicas (SCHIMIDT *et al.*, 2011). De fato, apesar do histórico ligado à desnutrição, o Brasil revela tendências de aumento da obesidade (BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003).

Além da melhoria das condições de saúde e de alimentação da população, a relação entre o estado nutricional precoce e suas repercussões na vida adulta pode ter influência nessa nova tendência (HALES e OZANNE, 2003). Diante da hipótese do fenótipo poupador (*thrifty phenotype hypothesis*), postula-se que o feto se adapta ao ambiente intrauterino desfavorável (HALES e BAKER, 1992). Esse processo adaptativo prioriza a formação de órgãos nobres em detrimento de outros e, embora essa adaptação seja inicialmente benéfica, pode ser prejudicial em longo prazo (DESAI e HALES, 1997). Em associação com fatores genéticos, um ambiente nutricional desfavorável durante estágios críticos de desenvolvimento também pode predispor o indivíduo às DCNTs (HANSON e GLUCKMAN, 2011). Então, se durante momentos de escassez de alimentos a eficiência em acumular foi favorável à sobrevivência, atualmente ocorre o inverso (VELLOSO, 2012). Além disso, ressalta-

se a preocupação sobre o aumento de hábitos alimentares pouco saudáveis associados ao comportamento sedentário no desenvolvimento das DCNTs (CROEZEN *et al.*, 2009; AL-HAZZAA *et al.*, 2011).

Atualmente, os hábitos alimentares da população são o resultado da abundância e facilidade de acesso aos “*junk foods*”, definidos como alimentos processados, palatáveis, hipercalóricos e muitas vezes privados de vitaminas e nutrientes essenciais (BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007). A falta de escolhas mais saudáveis e a conveniência da alimentação em “*fast-foods*” são os fatores que definem a chamada dieta ocidentalizada ou de cafeteria (CESARETTI e JUNIOR, 2006; BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007; BAYOL *et al.*, 2009). Tal dieta, também denominada dieta hiperlipídica, caracteriza-se por alimentos hipercalóricos, de alta palatabilidade, com teor elevado de carboidratos refinados, sal, grande quantidade de gorduras saturadas e/ou trans, baixo teor de vitaminas e nutrientes (ELAHI *et al.*, 2009; BAYOL *et al.*, 2010). Dessa forma, modelos experimentais têm sido usados para mimetizar os hábitos alimentares do mundo ocidental (DESAI e HALES, 1997; BAYOL *et al.*, 2009, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Estudos de experimentação animal mostram que a dieta hiperlipídica pode desencadear um desajuste metabólico associado com o aparecimento de obesidade e diabetes tipo II por aumentar de modo significativo os estoques de tecido adiposo (GAÍVA *et al.*, 2001) e diminuir a síntese de glicogênio em animais experimentais (KIM *et al.*, 2000). De fato, Estadella *et al.* (2004) defendem que a exposição a dietas ricas em gordura por períodos prolongados – cerca de oito semanas - resulta em balanço energético positivo em roedores. Tal experimento propõe a utilização de uma dieta elevada em lipídios, açúcares simples, cloreto de sódio e de alta palatabilidade, hipercalórica e de composição nutricional conhecida, elaborada com ingredientes naturais e semi-purificados (ESTADELLA *et al.*, 2004; 2011), a mesma utilizada no presente estudo.

Recentemente, muitos modelos animais com uma hipernutrição materna têm sido propostos para investigações do desenvolvimento da prole (AINGE *et al.*, 2011), são elas: alimentação convencional *ad libitum* de dieta rica em gordura (*high-fat diet*, *HFD*) (GUO e JEN, 1995; BUCKELEY *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2017); *HFD* suplementada com leite condensado (SAMUELSSON *et al.*, 2008); dieta rica em

gordura e/ou açúcar, denominada “*junk food*” ou dieta de cafeteria (BAYOL *et al.*, 2005; 2007; 2009). A HFD ou dieta hiperlipídica é definida como sendo qualquer dieta em que a gordura, independente do tipo ou fonte, constitui mais de 30% do conteúdo energético (kJ) total (AINGE *et al.*, 2011). Outra forma de manipulação da dieta inclui proporcionar um alto teor de proteína (DAENZER *et al.*, 2002) e todas resultam na síndrome metabólica.

Autores consideram que manipulação de dieta por si só provoca divergências de interpretação, pois um aumento de um componente da dieta requer redução de outro (ALFARADHI e OZANNE, 2011). Em muitos casos, o aumento de gordura é compensado por uma redução de carboidratos (SAMUELSSON *et al.*, 2008; NIVOIT *et al.*, 2009) ou conteúdo proteico (BAYOL *et al.*, 2005). Embora seja assumido que o aumento de gordura seja o fator causal para resultados no fenótipo e/ou genótipo, não é possível descartar que o baixo nível de proteína ou carboidrato contribui para o resultado dos estudos (ALFARADHI e OZANNE, 2011).

Outros estudos com manipulação de lipídios na dieta são relatados. Nos experimentos de Albuquerque *et al.* (2006), os animais consumiram uma dieta trans hidrogenada na gestação e lactação, houve diferença na atividade da insulina e o peso não foi aumentado. Nos estudos de Pisani *et al.* (2008a, b), os animais também experimentaram uma dieta rica em ácidos graxos trans durante a gestação e lactação e houve uma diminuição da expressão do RNAm da adiponectina – relacionada ao aumento da resistência à insulina e aumento da gordura corporal – nos animais de 21 dias, embora os animais tivessem o peso diminuído aos 90 dias. Além disso, De Oliveira *et al.* (2011) encontraram alterações em citocinas pró-inflamatórias, sinais de dislipidemia, diminuição da expressão de adiponectinas no tecido adiposo e não no músculo esquelético de filhotes aos 21 dias submetidos a uma dieta contendo gordura vegetal hidrogenada durante a gestação e lactação e os músculos sóleo e EDL responderam de forma diferente.

Por outro lado, Ashino *et al.* (2012) relataram que o consumo materno de HFD predispõe os filhotes a níveis aumentados de peso, insulina, fator de necrose tumoral α (TNF α) e a valores reduzidos de triglicerídeo no soro. Outro experimento com a dieta hiperlipídica perinatal resultou em aumento de peso nos animais, hiperglicemia e hipercolesterolemia (OLIVEIRA *et al.*, 2011). No estudo de Pisani *et*

al. (2008a) os níveis de triglicerídeos e colesterol foram aumentados nos filhotes. Da mesma forma, Oben *et al.* (2010), encontraram filhotes com aumento de peso corporal, além de níveis aumentados de insulina, leptina, triglicerídeos hepáticos e presença de esteatose no fígado. Houve ativação de núcleos hipotalâmicos de apetite, sinalizados pelo teor de gordura do leite materno (OBEN *et al.*, 2010). Ademais, também foi relatado que a dieta trans rica em ácidos graxos na gestação e lactação promove a inflamação hipotalâmica e a perda de saciedade, o que promove consequências metabólicas deletérias mesmo após a retirada do fator causal (PIMENTEL *et al.*, 2012).

No que se refere às repercussões da HFD durante a gestação e lactação no músculo esquelético, uma dieta de cafeteria induziu uma deficiência no desenvolvimento do músculo esquelético com achados de atrofia muscular e hipoplasia aos 21 dias e persistente na vida adulta (BAYOL, 2005). Além disso, havia resistência à insulina, aumento da adiposidade, redução da taxa de proliferação das células musculares, mas os pesos dos animais não foram diferentes (BAYOL, 2005). Tais modificações musculares ocorreram em contraste com a fisiologia, que retrata uma hiperplasia da fibra muscular na época do desmame (RAYNE e CRAWFORD, 1975). Assim, essa redução da taxa de proliferação das células musculares pode conduzir um reduzido potencial de crescimento muscular nos filhotes em longo prazo, além da homeostase da glicose prejudicada (BAYOL, 2005). Além disso, o consumo materno dessa dieta ocidentalizada durante a gestação e lactação provocou redução da força muscular nos filhotes (BAYOL *et al.*, 2009). Em estudo anterior, Bayol (2004) induziu uma desnutrição nos animais com a dieta reduzida para 40% *ad libitum* e não houve redução no número de fibras musculares na prole, o que justifica que o consumo de dietas ricas em gordura pode ser mais prejudicial para o desenvolvimento muscular que a desnutrição grave (BAYOL, 2004).

Nesse sentido, autores têm relatado a influência da HFD durante a gestação e lactação sobre a composição corporal, perfil lipídico, resistência à insulina, metabolismo hepático, desenvolvimento neuroendócrino, funcionamento do neuropeptídeo Y (NPY) (PISANI *et al.*, 2008b; KOZAK *et al.*, 2000; BAYOL *et al.*, 2010; ASHINO *et al.*, 2012; PLATT *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2017). Além disso,

um ambiente materno obesogênico tem sido mostrado com um fator que aumenta a adipogênese e diminui a miogênese durante o crescimento fetal da prole (TONG *et al.*, 2009). Esse ambiente obesogênico provoca uma insuficiência placentária e reduz o crescimento fetal (GODFREY e BARKER, 2011), o desenvolvimento do músculo esquelético pode ser preferencialmente suprimido, levando uma reduzida massa muscular (BROWN, 2014) e sarcopenia (PILEGGI *et al.*, 2016). Tal redução da massa muscular, devido a uma menor quantidade de fibras, persiste mesmo após a compensação do crescimento ou “*catch-up*”, pois o crescimento de recuperação favorece a deposição de gordura sobre o desenvolvimento muscular (DE BLASIO *et al.*, 2007).

Ademais, outros estudos afirmam que a sarcopenia também está presente na utilização HFD inclusive em períodos pós-desmame (D’SOUZA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2016; ESHIMA *et al.*, 2017). Há referências à diminuição da expressão de MyoD e miogenina, modificação na atividade de células satélites e baixa responsividade ao IGF-I (D’SOUZA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2016). Mudanças da capacidade de produção de força (CABRERA *et al.*, 2016; ESHIMA *et al.*, 2017) e proporção de tipo de fibra muscular também são relatados (MATASAKAS, 2009; ESHIMA *et al.*, 2017). A HFD é capaz de induzir um perfil oxidativo no músculo esquelético de ratos, embora humanos obesos geralmente apresentem maior quantidade de fibras glicolíticas (MATSAKAS, 2010). De fato, autores têm ressaltado que uma vez que a composição dos tipos de fibra musculares reflete a sua propriedade metabólica, é importante determinar como os tipos de fibra muscular são afetados pela gordura na dieta (MIZUNOYA *et al.*, 2013). Assim, as relações entre os tipos de fibra muscular sugere que as isoformas de miosina estão associadas a diferenças fenotípicas em propriedades contráteis e metabólicas dos tipos de fibra muscular (RIVERO, TALMADGE e EDGERTON, 1998).

Diante do exposto, observa-se um efeito negativo da nutrição materna desbalanceada sobre o desenvolvimento de função do músculo esquelético (PILEGGI *et al.*, 2016). Por outro lado, o impacto da dieta materna sobre a expressão de genes que desempenham função contrátil e metabólica do músculo é pouco descrito na literatura. Portanto, a realização de estudos a respeito da

capacidade de modificação dos padrões de expressão gênica é atual e relevante, a fim compreender a natureza da variabilidade fenotípica. No que se refere ao músculo esquelético, traria subsídios para interpretar os mecanismos subjacentes às alterações estruturais associadas à programação metabólica. Neste contexto, faz-se relevante entender que o crescimento e desenvolvimento do feto são controlados por fatores genéticos, determinantes do genoma fetal e também fatores ambientais como a nutrição materna (DESAI e HALES, 1997).

Assim, o presente estudo tem a hipótese de que o desenvolvimento e funcionamento da fibra muscular esquelética são influenciados pela exposição uma dieta hiperlipídica na gestação e lactação. Levando em consideração os efeitos da plasticidade fenotípica no processo de maturação de ratos jovens e adultos, propõe-se a analisar as repercussões dessa dieta durante o período crítico sobre a expressão gênica de proteínas envolvidas na miogênese e na função do músculo esquelético de ratos em curto e longo prazos.

3 HIPÓTESES

A dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação diminui a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese em ratos e diminui a expressão gênica de proteínas contráteis em diferentes músculos, em curto e longo prazo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos de uma dieta hiperlipídica ofertada durante a gestação e lactação sobre a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e de proteínas contráteis nos músculos sóleo e EDL em ratos.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos de uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre:

- a evolução ponderal das gestantes, dos filhotes e ao longo da vida dos animais;
- a resposta glicêmica e perfil lipídico dos animais em diferentes idades;
- a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese nos músculos sóleo e EDL;
- a expressão gênica de proteínas contráteis dos músculos sóleo e EDL.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e condições experimentais

O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa do Centro de Ciências Biológicas (Protocolo número: 23076.050504/2013-15), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (ANEXO I). Todos os controles ambientais foram feitos para minimizar o desconforto e o número de animais utilizados neste experimento.

Foram utilizados 81 ratos machos (provenientes de doze ninhadas) da linhagem Wistar, da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos em temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro invertido de 12 horas (claro: 18 às 6h; escuro: 6 às 18h) e receberam água e ração *ad libitum*. Fêmeas nulíparas (220-260g) foram acasaladas na proporção de 1:2 para macho e fêmea. Após confirmação da prenhez por esfregaço vaginal, as fêmeas passaram a receber as dietas que caracterizaram os grupos experimentais. No 1º dia pós-natal, as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes cada. Quando a ninhada continha número de filhotes machos insuficiente, completou-se a ninhada com fêmeas durante a lactação, a fim de ajustar para oito filhotes. A manipulação nutricional ocorreu durante o período de gestação e lactação.

5.2 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram formados a partir do primeiro dia da gestação e foram divididos de acordo com a manipulação nutricional que ocorreu em dois grupos:

- *Grupo Controle (C)* (n=46) – Todos com filhotes amamentados por nutrízes que receberam dieta controle (Nuvilab®, CR1, Brasil), padrão do biotério.
- *Grupo Hiperlipídico (H)* (n = 35) – Todos com filhotes amamentados por nutrízes que receberam a HFD, previamente padronizada (ESTADELLA *et al.*, 2004; ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2017), constituída de uma mistura de ingredientes: ração padrão (Nuvilab®, CR1, Brasil), amendoim cru, chocolate ao leite e biscoito maisena na proporção 3:2:2:1, ofertados em forma de péletes (Tabela 1).

A HFD foi confeccionada no Departamento de Nutrição da UFPE. A análise de composição centesimal foi realizada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) (Tabela 1) (ANEXO II). A manipulação nutricional ocorreu durante o período de gestação e lactação. No 22º dia após o nascimento, os conceptos foram desmamados e todos os animais passaram a receber a dieta padrão do biotério até o final do experimento.

Tabela 1. Composição centesimal das dietas experimentais

Nutrientes	Ração padrão* (g/100g)	HFD (g/100g)
Carboidratos	47,76	38,08
Proteínas (N x 6,25)	28,85	27,24
Lipídios	5,63	25,37
Cinzas	7,91	4,88
Umidade e substâncias voláteis	9,85	4,43
Energia total (Kcal/100g)	357,11	489,61
Carboidratos (%VET)	53,50	31,11
Proteínas (%VET)	32,31	22,26
Lipídios (%VET)	14,19	46,63

A composição centesimal foi analisada pelo Laboratório de análises de alimentos-UFPE. *Nuvilab®, CR1, Brasil.

5.3 Parâmetros Somáticos

A mensuração do peso corporal foi realizada semanalmente nas gestantes e lactantes. A partir do 1º dia de vida pós-natal até o desmame, com intervalo de sete dias, e posteriormente, nas idades de 30, 90 e 180 dias. Para medida de peso foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca MARTE (Modelo ASF11), capacidade máxima 500g e mínima 0,002g. Os dados obtidos serviram para calcular a porcentagem de ganho de peso corporal (GPC) através da seguinte fórmula: %GPC = [peso corporal final (g) X 100/peso do 1º dia de gestação (g)] – 100 (BAYOL *et al.*, 2004).

5.4 Teste de tolerância à glicose

Para a realização do teste de tolerância à glicose (TTG), os animais, no 70º e 150º dias e submetidos a 12 horas de jejum, foram pesados e em seguida submetidos à injeção intraperitoneal (2g/Kg) de glicose a 50% (BIELOHUBY *et al.*, 2013). Amostras de sangue foram obtidas da veia caudal imediatamente antes da administração de glicose e 30, 60, 90, 120 minutos após a injeção. As amostras de sangue foram analisadas prontamente com um glicosímetro Accu-check Active® e suas tiras de teste correspondentes (Roche, Mannheim, Germany). Dados de glicemia expressos em mmol/L, a resposta ao TTG é dada pela área sob a curva do gráfico, expressa em unidades arbitrárias.

5.5 Coleta de amostras

Os filhotes machos foram sacrificados por decapitação aos 22, 90 e 180 dias, entre sete e oito horas da manhã, após um período de 12 horas de jejum. Sangue do tronco foi coletado, vertendo o corpo do animal sobre um funil acoplado ao tubo de ensaio, e centrifugado a 3500 rpm, 4°C, por 20 minutos para obter o soro. Para análise de expressão gênica, os músculos sóleo e EDL foram cuidadosamente dissecados, colocados em tubos criogênicos estéreis, imediatamente congelados em gelo seco e mantidos a -80°C até a análise.

5.6 Análise Bioquímica do Soro

Foram avaliados os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos através de ensaio colorimétrico de ponto final, utilizando o Kit de Glicose PAP Liquiform, o Kit de Colesterol Liquiform e o Kit de Triglicérides Liquiform, respectivamente (Labtest, Lago Santa, Minas Gerais, Brasil) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dados expressos em mg/dL.

5.7 Análise da expressão gênica através do PCR em tempo real

O experimento de PCR em tempo real foi realizado com as amostras de músculos sóleo e EDL seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O método consiste em três etapas: 1) Extração do RNA Total; 2) Conversão do RNA

em cDNA e 3) Amplificação da reação em cadeia da polimerase. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen[®] e, subsequentemente, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliado utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com solução de gDNA Wipeout (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42°C, e armazenados em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 microgramas de RNA purificado em cDNA, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização.

Posteriormente, 5 ml de cada amostra diluída de cDNA foi utilizada como *template* para a amplificação por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Utilizou-se o sistema de detecção de PCR em tempo real: Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen[®], Hilden, Alemanha). Os parâmetros do PCR foram: o primeiro passo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 5s a 95°C, e 10s a 60°C. Os oligonucleotídeos ou “primers” utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de *primers* usados para amplificação.

Gene	Foward Primer	Reverse Primer
<i>myod</i>	ACTCTGCTTCTCCTCCTG	TTCTCACATCTGGCTTGG
<i>miogenina</i>	GAGAAGGGAGGGAACGATAGGG	TGGCATCAGCACAGGAGACC
<i>actina</i>	TATGTATGTGGCTATTCAG	ATCAGGTAGTCAGTAAGG
<i>miosina I</i>	TCTCTATCTCTGACAACGCCTAC	TGCTTCCTCCTTCTTCTTCC
<i>miosina IIa</i>	GGAGAAGACTAAGCAGCGGTTG	CAGCACAGGCAGCGTTGG
<i>miosina IIb</i>	TTCTCCATCTCTGATAATGCCTAC	GCTTCCTCCTTCTTCTTGTCC
<i>Gapdh</i>	GCGAGATCCCGTCAAGATCA	CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG

Sequência de *primers* desenhados para estudo de *myod*, *miogenina*, *actina*, *miosina I*, *IIa*, *IIb* e do gene constitutivo de referência *gapdh*.

Os valores limites de ciclo (CT, do inglês, “*cycle threshold*”) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência *versus* o número de ciclos do PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos *primers* (ou oligonucleotídeos) foram geradas traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template* (molde) alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência (ou *house-keeping*): *desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato* (GAPDH). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado utilizando um método CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi usada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado com o de referência endógena GAPDH: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a CT do gene de interesse e do GAPDH, e $\Delta\Delta CT$ para a amostra é igual à média do ΔCT da amostra do grupo experimental, menos a média do ΔCT da amostra do grupo controle (utilizada como parâmetro para calibração).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para todas as análises. Ao confirmar a normalidade dos dados, para o peso corporal materno na gestação, assim como o peso, percentual de ganho de peso dos filhotes e TTG foram utilizados ANOVA two-way medidas repetidas (fatores: dieta e tempo) com pós-teste de Bonferroni. Para os dados de bioquímica do soro, área sob a curva do TTG e expressão gênica foi realizado o teste t Student. Variáveis são apresentadas como média e desvio padrão. O nível de significância adotado foi $\alpha < 0,05$ para todas as análises.

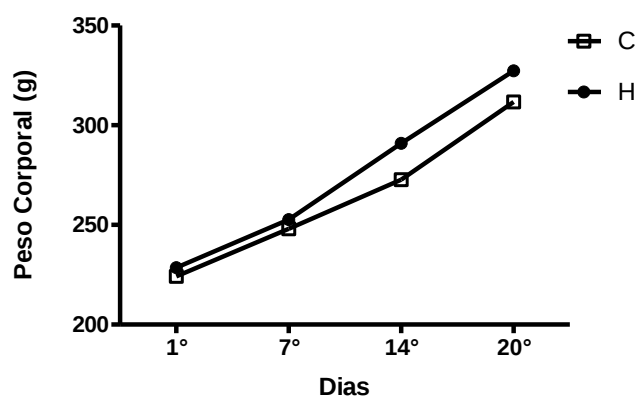
7 RESULTADOS

No presente estudo, foram avaliados o perfil ponderal, aspectos bioquímicos do soro e a expressão gênica de fatores reguladores da miogênese e de proteínas relacionadas às funções contráteis e metabólicas dos músculos sóleo e EDL – MyoD, Miogenina, Actina, Miosina I, Miosina IIa e Miosina IIb – em ratos de diferentes idades e cujas mães foram submetidos ou não à ingestão de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação.

7.1 Evolução ponderal dos animais na gestação.

Não foram observadas diferenças entre os grupos no peso corporal das ratas durante todo o período gestacional (1° dia: C = $224,2 \pm 7,93\text{g}$, n=6 vs. H = $228,5 \pm 12,23\text{g}$, n=4; $p > 0,05$; 7° dia: C = $248,1 \pm 9,91\text{g}$, n=6 vs. H = $252,7 \pm 23,10\text{g}$, n=4; $p > 0,05$; 14° dia: C = $272,7 \pm 24,25\text{g}$ vs. H = $290,9 \pm 50,49\text{g}$, n=4; $p > 0,05$; 20° dia: C = $311,7 \pm 38,09\text{g}$, n=6 vs. H = $327,4 \pm 49,34\text{g}$, n=4; $p > 0,05$) (Figura 3).

Figura 3. Peso corporal na gestação



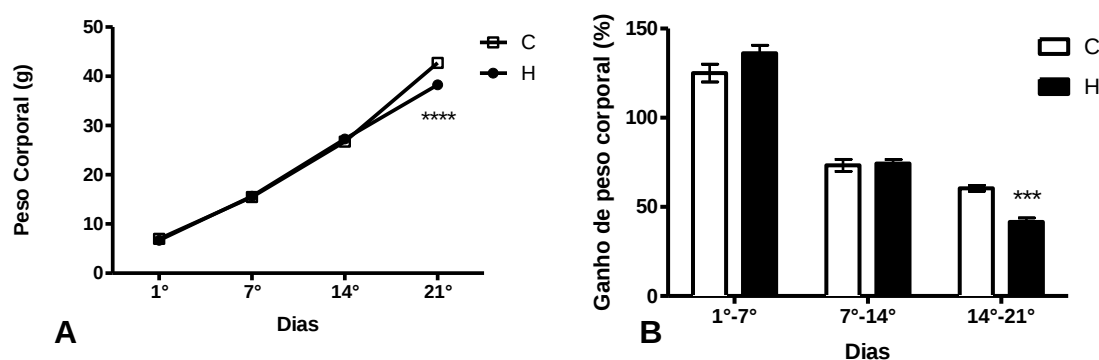
Peso corporal na gestação. Grupos: controle (C, n=6); HFD (H, n=4). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni.

7.2 Evolução ponderal da prole na lactação

Quanto aos filhotes, durante a lactação, o perfil corporal não apresentou diferenças entre os grupos no 1°, 7° e 14° dias, porém os filhotes H apresentaram menor peso aos 21 dias de vida (1° dia: C= $6,98 \pm 0,91$ g, n=46 vs. H= $6,67 \pm 1,97$ g, n=35; $p > 0,05$; 7° dia: C= $15,49 \pm 1,73$ g, n=46 vs. H= $15,65 \pm 4,39$ g, n=35; $p > 0,05$; 14° dia: C= $26,73 \pm 3,89$ g, n=46 vs. H= $27,26 \pm 4,38$ g, n=35; $p > 0,05$; 21° dia: C= $42,71 \pm 5,86$ g, n=46 vs. H= $38,28 \pm 5,03$ g, n=35; $p < 0,01$) (Figura 4A).

A porcentagem de ganho de peso, avaliada do 1° ao 21° dia pós-natal, foram semelhantes no intervalo entre 1-7 dias, 7-14 dias e 68, 73% menor no H entre o 14° e 21° dias (1°-7° dia: C= $125,1 \pm 33,97\%$, n=46 vs. H= $136,1 \pm 27,18\%$, n=35; $p > 0,05$; 7°-14° dia: C= $73,30 \pm 22,55\%$, n=46 vs. H= $74,35 \pm 13,14\%$, n=35, $p > 0,05$; 14°-21° dia: C= $60,41 \pm 11,06\%$, n=46 vs. H= $41,52 \pm 13,62\%$, n=35; $p < 0,01$) (Figura 4B).

Figura 4. Peso corporal e ganho de peso corporal da prole durante a lactação.

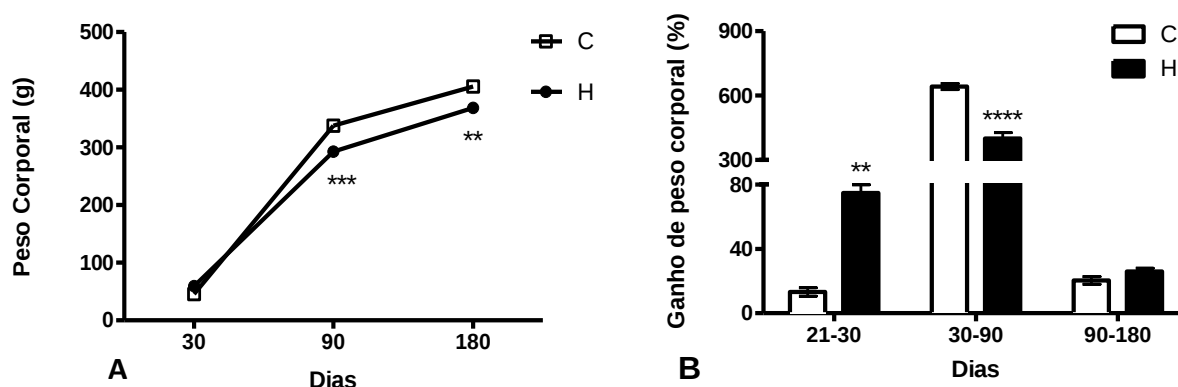


Peso corporal (A) e ganho de peso corporal (B) da prole durante a lactação. Grupos: Controle (C, n= 46); HFD (H, n=35). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste two way ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni, *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Após o desmame, os animais foram avaliados na idade de 30, 90 e 180 dias. Os animais não apresentaram diferenças entre os grupos no peso corporal aos 30 dias. Entretanto, aos 90 e 180 dias, os filhotes do grupo H exibiram menores pesos

em relação aos filhotes C (30 dias: C= $45,67 \pm 1,38$ g, n=11 vs. H= $59,32 \pm 6,8$ g, n=7, p=; 90 dias: C= $337,7 \pm 8,15$ g, n=11 vs. H= $292,9 \pm 4,0$ g, n=7; p<0,001; 180 dias: C= $405,8 \pm 9,4$ g, n=11 vs. H= $368,6 \pm 19,6$ g, n=7, p<0,001) (Figura 5A). Em relação à porcentagem de ganho de peso, no intervalo entre 21-30 dias, animais cujas mães consumiram HFD apresentaram maiores ganhos (C= $13,22 \pm 8,74\%$, n=11 vs. H= $74,72 \pm 13,25\%$, n=7, p<0,0001). No entanto, no intervalo 30-90 dias, animais do grupo H ganharam menos peso (C= $642,1 \pm 46,39\%$, n=11 vs. H= $400,7 \pm 70,83\%$, n=7, p<0,05). O percentual de ganho de peso entre 90 -180 dias foi semelhante entre os grupos (C= $20,4 \pm 7,82\%$, n=11 vs. H= $25,85 \pm 5,63\%$, n=7, p>0,05) (Figura 5B).

Figura 5. Peso corporal, ganho de peso da prole de ratos pós-desmame.



Peso corporal (A), ganho de peso (B) da prole de ratos pós-lactação. Grupos: Controle (C, n= 11); HFD (H, n=7). Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA two way seguido do pós-teste Bonferroni, ***p<0,01; ****p<0,001.

7.3 Perfil bioquímico do soro

Durante o período após a lactação, aos 22, 90 e 180 dias, foram analisados parâmetros bioquímicos do soro dos animais. Os níveis de triglicerídeo mostraram-

se diminuídos nos filhotes do grupo H aos 22 dias. A glicemia e colesterol total foram semelhantes entre os grupos em todas as idades (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos do soro da prole submetida à HFD durante a gestação e lactação.

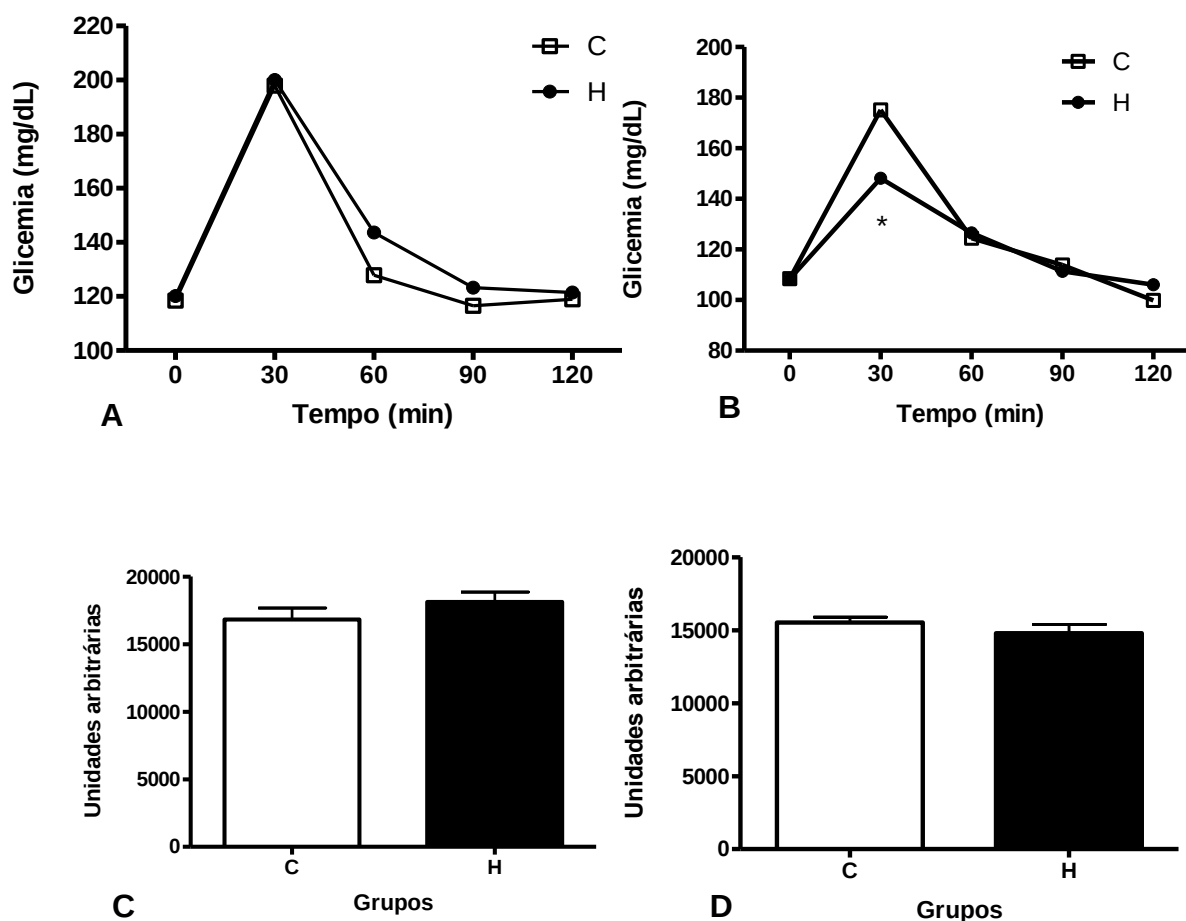
	Grupo Controle (N=4-9)	Grupo HFD (N=5-10)	P
22 dias			
Triglicerídeo (mg/dL)	71,78 ± 17,06	40,30 ± 13,26	0,0028*
Glicose (mg/dL)	101,1 ± 16,09	109,8 ± 19,73	0,4673
Colesterol (mg/dL)	67,91 ± 12,16	58,67 ± 13,81	0,2176
90 dias			
Triglicerídeo (mg/dL)	66,70 ± 18,40	70,96 ± 20,97	0,6715
Glicose (mg/dL)	104,3 ± 12,75	118,2 ± 32,82	0,3837
Colesterol (mg/dL)	52,53 ± 14,20	46,39 ± 17,13	0,5713
180 dias			
Triglicerídeo (mg/dL)	47,95 ± 6,41	55,30 ± 15,27	0,2858
Glicose (mg/dL)	93,48 ± 33,73	103,9 ± 18,56	0,4515
Colesterol (mg/dL)	31,38 ± 6,06	36,87 ± 18,56	0,0879

Resultados apresentados em média ± DP. Teste Kolmogorov-Smirnov, seguido do Test t, *p<0,05.

7.4 Tolerância à glicose pós-lactação

Aos 70 dias, filhotes de mãe que receberam dietas controle e HFD exibiram a mesma resposta à glicose, como indicado pelas taxas idênticas de aumento da glicemia entre o tempo zero e 30 minutos, assim como a sua diminuição entre 30 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose (Figura 6A). Entretanto, aos 150 dias, animais do grupo H apresentaram menor pico de glicemia no 30º minuto (C= 175,2 ± 8,28 mmol/L, n = 5; H= 148,1 ± 5,68 mmol/L, n=9; p<0,05) (Figura 6B). A área sob a curva (AUC), correspondente ao TTG foi semelhante entre os grupos em ambas as idades (Figura 6C, D).

Figura 6. Resposta glicêmica ao teste de tolerância à glicose aos 70 (A, C) e 150 dias (B, D).



Concentração de glicose e área sob a curva nos grupos C e H após a injeção intraperitoneal de glicose aos 70 (A, C) e 150 dias (B, D). Grupos: Controle (C, n= 11); HFD (H, n=7). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Glicemia: Teste ANOVA two way seguido do pós-teste Bonferroni. Área sob a curva: Teste t, * $p < 0,01$.

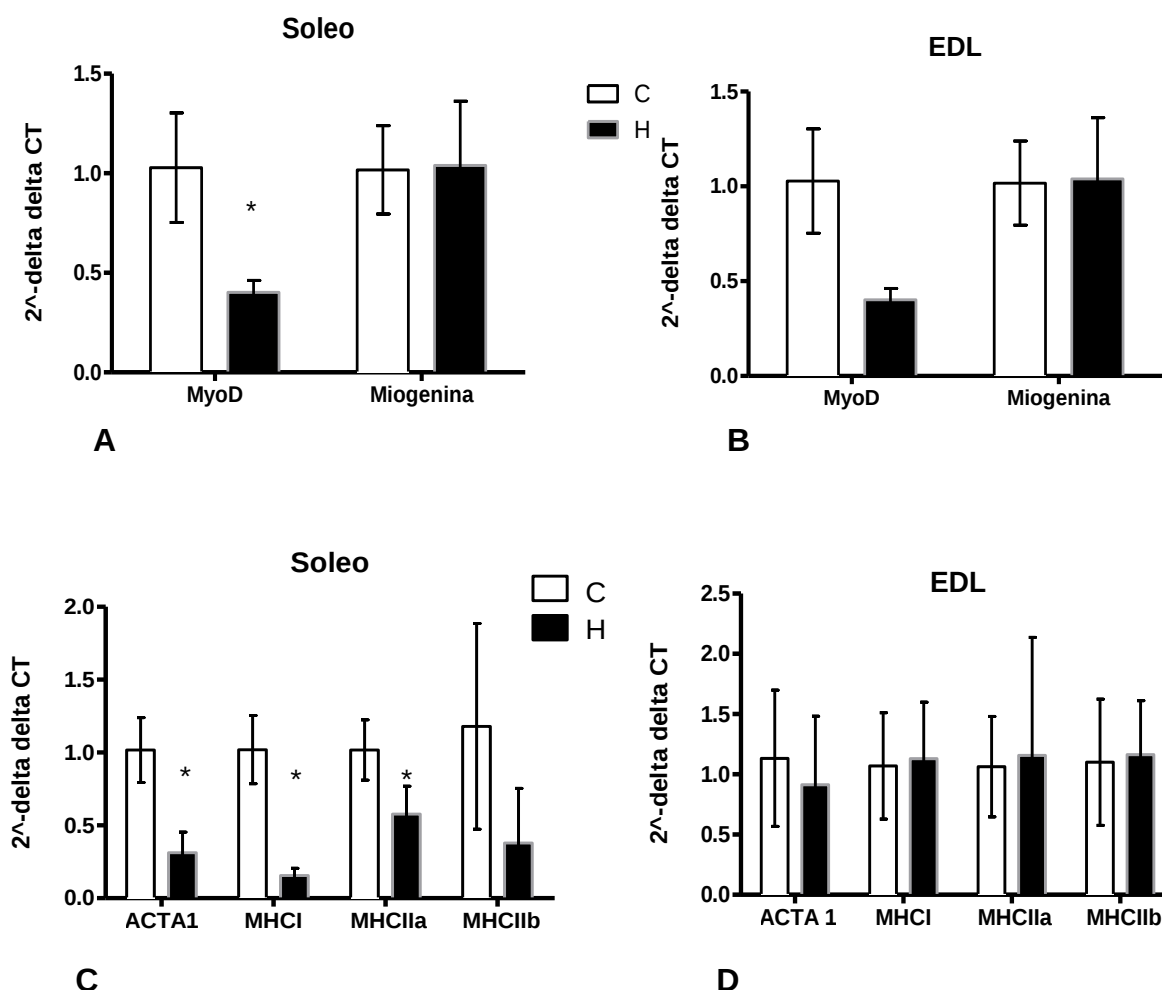
7.5 Expressão gênica de fatores miogênicos e proteínas contráteis do sóleo e EDL de filhotes aos 22 dias

No músculo sóleo, houve diminuição em aproximadamente 39% na expressão do RNAm do MyoD, 30% do RNAm da actina, 15% da expressão gênica da miosina I e de cerca de 57% na expressão do gene miosina IIa no grupo H. Não houve

diferença na expressão do RNAm da miogenina e miosina IIb entre os grupos (MyoD: $C = 1,028 \pm 0,27$; $n=5$ vs. $H = 0,40 \pm 0,06$, $n=5$, $p=0,001$; Migenina: $C = 1,02 \pm 0,22$; $n=4$ vs. $H = 1,04 \pm 0,32$; $n=4$, $p=0,91$, Acta 1: $C = 1,02 \pm 0,22$, $n=3$ vs. $H = 0,31 \pm 0,14$, $n=4$, $p=0,0036$; MHC1: $C = 1,02 \pm 0,23$, $n=4$ vs. $H = 0,15 \pm 0,05$, $n=4$, $p=0,0004$; MHCIIa: $C = 1,02 \pm 0,21$, $n=4$ vs. $H = 0,58 \pm 0,19$, $n=4$, $p=0,02$; MHCIIb: $C = 1,18 \pm 0,70$, $n=4$ vs. $H = 0,38 \pm 0,37$, $n=4$, $p=0,09$) (Figura 7A, C).

No músculo EDL, não houve nenhuma diferença na expressão dos genes avaliados (MyoD: $C = 1,04 \pm 0,31$; $n=4$ vs. $H = 3,18 \pm 2,92$; $n=5$, $p=0,10$; Miogenina: $C = 1,66 \pm 0,62$; $n=5$ vs. $H = 2,51 \pm 2,37$; $n=5$, $p=0,25$; Acta 1: $C = 1,33 \pm 0,565$, $n=4$ vs. $H = 0,91 \pm 0,56$, $n=5$, $p=0,58$; MHC1: $C = 1,07 \pm 0,44$, $n=4$ vs. $H = 1,130 \pm 0,47$, $n=3$, $p=0,87$; MHCIIa: $C = 1,06 \pm 0,42$, $n=3$ vs. $H = 1,15 \pm 0,98$, $n=3$, $p=0,88$; MHCIIb: $C = 1,1 \pm 0,52$, $n=5$ vs. $H = 1,16 \pm 0,45$, $n=4$, $p=0,84$) (Figura 7B,D).

Figura 7. Expressão gênica de fatores miogênicos e proteínas contráteis no sóleo e EDL aos 22 dias.



Os pares de colunas representam a expressão de níveis relativos de RNAm de actina, miosina I, IIa e IIb nos músculos sóleo (A,C) e EDL (B,D) para o endógeno GAPDH amplificados na mesma amostra sob as mesmas condições experimentais. Grupos: Controle (C); HFD (H). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kolmogorov Smirnov, Teste t, * $p < 0,05$.

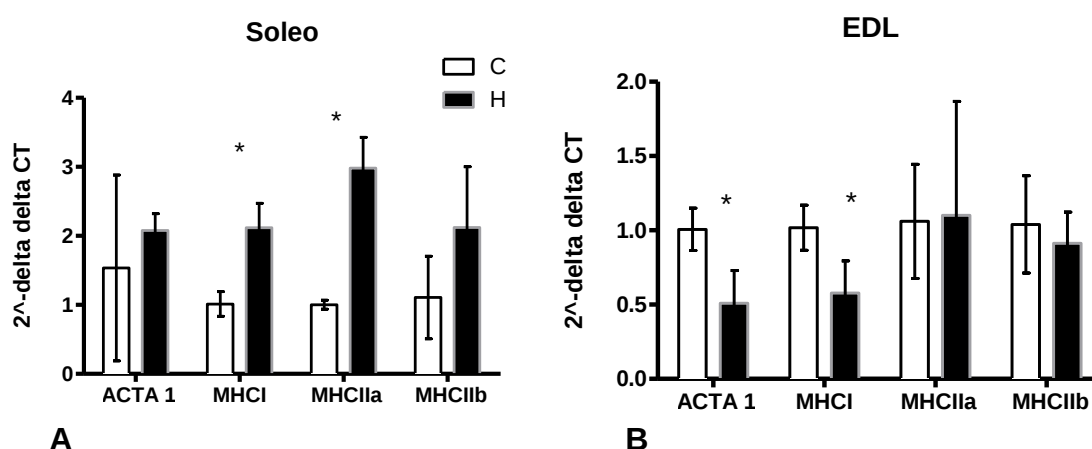
7.6 Expressão gênica de proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 90 dias

Aos 90 dias, filhotes de mães que receberam HFD apresentaram aumento na expressão gênica das miosinas I (116%) e IIa (198%) no sóleo, não apresentando diferença nos outros genes avaliados: Acta 1: C= $1,53 \pm 1,34$, n=4 vs.

H= $2,08 \pm 0,24$, n=4, p=0,45; MHC1: C= $1,01 \pm 0,17$, n=3 vs. H= $2,18 \pm 0,35$, n=4, p=0,0044; MHCIIa: C= $1,0 \pm 0,06$, n=3 vs. H= $2,98 \pm 0,44$, n=4, p=0,0007; MHCIIb: C= $1,108 \pm 0,59$, n=4 vs. H= $2,12 \pm 0,88$, n=4, p= 0,1053) (Figura 8A).

Por outro lado, no EDL os genes actina e miosina I apresentaram-se com menor expressão nos filhotes do grupo H, com diminuição de 51% e 56% respectivamente. A expressão gênica não variou na miosina IIa e IIb aos 90 dias no EDL (Acta 1: C= $1,00 \pm 0,14$, n=3 vs. H= $0,51 \pm 0,21$; n=3, p=0,03; MHC1: C= $1,01 \pm 0,15$, n=4 vs. H= $0,57 \pm 0,21$, n=4, p=0,01; MHCIIa: C= $1,06 \pm 0,38$, n=5 vs. H= $1,1 \pm 0,77$, n=5, p=0,919; MHCIIb: C= $1,04 \pm 0,32$, n=5 vs. H= $0,91 \pm 0,21$, n=5, p=0,48) (Figura 8B).

Figura 8. Expressão gênica das proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 90 dias.

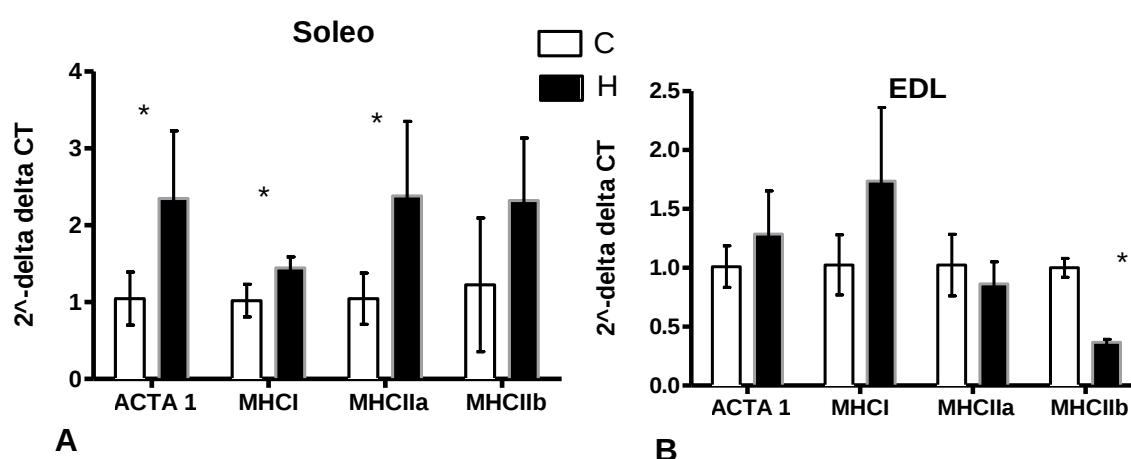


Os pares de colunas representam a expressão de níveis relativos de RNAm de actina, miosina I, IIa e IIb nos músculos sóleo (A) e EDL (B) para o endógeno GAPDH amplificados na mesma amostra sob as mesmas condições experimentais em animias com 90 dias. Grupos: Controle (C); HFD (H). Valores expressos em média $\pm$ DP. Kolmogorov Smirnov, Teste t, *p<0,05.

7.7 Expressão gênica de proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 180 dias

Aos 180 dias de vida, houve aumento nos níveis de expressão gênica da actina (124%), miosinas I (41,17%) e IIa (129%) no músculo sóleo (Acta 1: $C = 1,046 \pm 0,34$, $n=5$ vs. $H = 2,35 \pm 0,87$, $n=4$, $p=0,0178$; MHC1: $C = 1,02 \pm 0,21$, $n=5$ vs. $H = 1,44 \pm 0,14$, $n=4$, $p=0,015$; MHCIIa: $C = 1,04 \pm 0,33$, $n=5$ vs. $H = 2,38 \pm 0,96$, $n=4$, $p=0,0223$; MHCIIb: $C = 1,22 \pm 0,87$, $n=4$ vs. $H = 2,32 \pm 0,81$, $n=4$, $p=0,115$). No EDL, houve diminuição de 39% na expressão gênica da miosina IIb aos 180 dias (Acta 1: $C = 1,01 \pm 0,17$, $n=4$ vs. $H = 1,28 \pm 0,36$, $n=3$, $p=0,23$; MHC1: $C = 1,02 \pm 0,25$, $n=4$ vs. $H = 1,73 \pm 0,62$, $n=3$, $p=0,089$; MHCIIa: $C = 1,02 \pm 0,26$, $n=3$ vs. $H = 0,86 \pm 0,18$, $n=3$, $p=0,43$; MHCIIb: $C = 1,00 \pm 0,08$, $n=3$ vs. $H = 0,36 \pm 0,02$, $n=3$, $p=0,0002$) (Figura 9).

Figura 9. Expressão gênica das proteínas contráteis no sóleo e EDL da prole aos 180 dias



Os pares de colunas representam a expressão de níveis relativos de RNAm de actina, miosina I, IIa e IIb nos músculos sóleo (A) e EDL (B) para o endógeno GAPDH amplificados na mesma amostra sob as mesmas condições experimentais em animais com 180 dias. Grupos: Controle (C); HFD (H). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kolmogorov Smirnov, Teste t, * $p < 0,05$.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo foram examinados os efeitos de uma HFD durante a gestação e lactação no crescimento pós-natal, tolerância à glicose, bioquímica do soro e a transcrição de genes que são conhecidos por fazer parte do mecanismo de contração muscular, assim como regular o perfil do tipo de fibra, atuando no metabolismo do músculo esquelético.

A literatura relata os efeitos da desnutrição no período crítico sobre a expressão de genes que controlam o crescimento muscular. Entretanto, ainda há poucas referências acerca da administração de uma HFD nesse período. No presente estudo foram avaliados os efeitos da HFD durante a gestação e lactação no peso gestacional e pós-natal, percentual de ganho de peso, bioquímica do soro e transcrição de genes que são conhecidos por regular o desenvolvimento do tecido muscular, em filhotes de ratos.

Peso gestação e lactação

Estudos prévios têm demonstrado que a manipulação nutricional durante o período crítico de desenvolvimento induz modificações fisiológicas e metabólicas no organismo como estratégia para sobreviver e se desenvolver (BARKER, 2003; OZANNE & HALES, 2004; GLUCKMAN *et al.*, 2005). Essas mudanças são caracterizadas em termos de ganho de peso, alterações na ingestão alimentar, desordens metabólicas, disfunção hormonal, função muscular (BAYOL *et al.*, 2009; DE BLASIO *et al.*, 2007; CAVALCANTI *et al.*, 2013; D'SOUZA *et al.*, 2015; PILEGGI *et al.*, 2016).

A dieta materna não provocou aumento de peso nas gestantes, assim como já é retratado na literatura (KOZAK *et al.*, 2000; OBEN *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2013). Entretanto, há registros que uma dieta materna rica em gordura pode provocar aumento de peso nas mães e na prole de ratos (DE BLASIO *et al.*, 2007; BAYOL *et al.*, 2010; LATOUCHE *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos relataram um baixo peso ao nascer em filhotes após uma HFD durante a gestação e lactação (AKYOL *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2017). Em concordância com estudos anteriores, nossos resultados mostraram que filhotes de ratos submetidos a uma

HFD durante a gestação e lactação não apresentaram diferenças no peso nem no perfil bioquímico durante a lactação (PISANI *et al.*, 2008; PLATT *et al.*, 2014; ESHIMA *et al.*, 2017). Os resultados divergentes podem ser devido as diferenças nas dietas experimentais utilizadas nos experimentos principalmente em relação as proporções dos macronutrientes carboidratos, lipídios e proteínas (CAVALCANTE *et al.*, 2013; ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2017).

Nossos resultados mostraram, ao desmame, menor peso e mais baixos níveis de triglicerídeos nos filhotes cujas mães receberam dietas hiperlipídica durante a gestação e lactação. Estudos prévios justificam o menor peso por uma menor ingestão de dieta (CAVALCANTE *et al.*, 2013; ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2017). Esta redução da ingestão pode ser atribuída à alta densidade de energia da HFD. Dietas que contém 30% ou mais de energia derivada de gordura induzem a saciedade em roedores como resultado do aumento da ingestão de energia e eficiência de armazenamento energético (HILL *et al.*, 2000; HARIRI & THIBAUT, 2010). Além disso, a termogênese induzida pela dieta pode influenciar a ingestão de alimentos em animais submetidos a dieta HFD (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Peso pós-lactação

Resultados de estudos anteriores indicam que filhotes de ratas alimentadas com HFD durante a gestação e lactação apresentam um fenótipo obeso (i. e. aumento do peso corporal, hiperleptinemia, tolerância à glicose prejudicada), que aparece nas primeiras semanas pós-natal e é mantido até a vida adulta (PURCELL *et al.*, 2011; ROTHER *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012). No presente estudo, animais do grupo H apresentaram maior percentual de ganho de peso no intervalo de 21-30 dias e menor ganho dos 30-90 dias. Ademais, a prole de mães que receberam a HFD teve menor peso aos 90 e 180 dias. Apesar de um maior ganho ao final do desmame até os 30 dias, o peso entre os animais C e H tornam-se similares e depois há um déficit ponderal na vida adulta em longo prazo, de acordo com dados publicados anteriormente (KOZAK *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; PISANI *et al.*, 2008b). Entretanto, nossos resultados discordam de outros achados já relatados (HAUSMAN *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2011; AKYOL *et al.*, 2012; PLATT *et al.*, 2014). Resultados prévios relatam que HFD perinatal pode levar a aumento dos níveis de insulina e a uma mal-programação (*malprogramming*) em

reguladores centrais do peso corporal e metabolismo (SNIRIVASAN *et al.*, 2006). Pode ocorrer uma adaptação precoce de mecanismos hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006), com menores níveis de RNAm do neuropeptídeo Y (NPY), o que leva a uma hipofagia (WANG *et al.*, 2002; DZIEDZIK *et al.*, 2007). Por outro lado, há evidências de que um aumento da sensibilidade de receptores ao NPY não foi suficiente para permitir um maior ganho de peso (KOZAK *et al.*, 2000). Outros autores justificam o menor ganho de peso por uma termogênese adaptativa (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Perfil glicêmico e lipídico pós-lactação

Os níveis de glicemia triglicerídeos, o e colesterol total foram similares entre os grupos nas idades de 90 e 180 dias, o que difere dos dados da literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2011; ELAHI, 2009; HUANG *et al.*, 2017). No TTG, não houve diferenças, embora os animais H, aos 150 dias, tenha apresentado um menor pico de glicemia aos 30 minutos de teste. Outros estudos também relataram um TTG normal (PLATT *et al.*, 2014) e aumento dos níveis de insulina (LATOUCHE *et al.*, 2014) em ratos adultos após HFD durante a gestação e lactação. Evidências apontam que o consumo de HFD causa desajustes metabólicos e tendência para acúmulo de gordura no fígado, músculo esquelético, além do aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (ESTADELLA *et al.*, 2004. PISANI *et al.*, 2008a; BAYOL *et al.*, 2009; OBEN *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2015). No presente estudo, a manipulação nutricional materna ainda não foi suficiente para modificar os parâmetros bioquímicos do soro e provocar resistência à insulina nos filhotes, mesmo em longo prazo. Isso pode ser explicado pela existência de uma capacidade adaptativa de flexibilidade em relação ao combustível energético utilizado, ou seja, uma adequação do metabolismo em resposta à ingestão de nutrientes e demanda energética do organismo, que é responsável por uma resposta eficaz às alterações alimentares (SIEMELINK *et al.*, 2002; PISANI *et al.*, 2008a; DUBÉ *et al.*, 2014; BROOK *et al.*, 2016).

Expressão gênica de fatores miogênicos e proteínas contráteis em curto prazo

Estudos têm mostrado que a dieta materna pode influenciar a maturação de padrões morfológicos e funcionais dos filhotes (KUNZ & KING, 2007; MEHTA, 2008).

Os resultados do presente estudo evidenciaram mudanças na transcrição de genes da regulação da miogênese e função contrátil na prole. Nossos dados demonstraram que a expressão de RNAm do MyoD, actina, miosina I e IIa foram diminuídas no músculo sóleo no grupo H aos 22 dias. Já no músculo EDL, a expressão desses genes não foi modificada pela dieta materna. Há uma diferente regulação da expressão de genes miogênicos e contráteis entre músculos do tipo lento e rápido (MIZUNOYA *et al.*, 2013). De fato, outros autores ressaltam a necessidade de considerar que esses músculos têm diferenças em suas características contráteis e metabólicas (DAVIS *et al.*, 1989) e processos miogênicos (ESHIMA *et al.*, 2017).

MyoD é marcado pela sua capacidade de transformar uma variedade de tipos de células em mioblastos durante a miogênese, e tem uma importante função como regulador da formação de células musculares e diferenciação do tipo de fibra durante o desenvolvimento (PERDIGUERO *et al.*, 2009). Além disso, é um fator miogênico detectado em células satélites ativas (GROUNDS *et al.*, 1992; CORNELISON & WOLD, 1997). Os resultados do presente estudo refletem diminuição do nível de expressão gênica do MyoD, o que pode significar redução no potencial de diferenciação celular e diminuição da atividade das células satélites no músculo sóleo dos filhotes HFD aos 22 dias.

Tais dados estão de acordo com a literatura, que retrata um desenvolvimento inadequado de células satélites ao desmame em resposta à HFD, assim como uma baixa responsividade ao IGF-I (*Insulin Growth Factor I*), que está associado ao processo de ativação gênica, sinalizando aumento de transcrição de proteínas contráteis (CAVALCANTI *et al.*, 2013; D'SOUZA *et al.*, 2015). Além disso, podem traduzir diminuição da fase proliferativa da miogênese (ZOU *et al.*, 2017). Nesta idade, as células satélites estão com uma intensa atividade funcional. Com esta regulação negativa da miogênese, pode ocorrer um atraso no processo de desenvolvimento muscular do sóleo, o que significa um retardo no amadurecimento e diferenciação desse músculo (KALBE, 2017; ZOU *et al.*, 2017). Outros estudos que utilizaram a HFD durante a gestação e lactação também registraram atraso no desenvolvimento muscular dos filhotes (BAYOL *et al.*, 2005; D'SOUZA *et al.*, 2015; PILEGGI *et al.*, 2016). Pantaleão *et al.* (2013) também referiram uma baixa atividade

de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e reduzido desenvolvimento do músculo aos 21 dias.

A expressão gênica das proteínas contráteis mostrou-se diminuída no sóleo no H. Em estudos prévios, houve atrofia muscular, redução da taxa de proliferação das células musculares ao desmame (BAYOL *et al.*, 2005; PILEGGI *et al.*, 2016). Os níveis de RNAm das proteínas contráteis pode significar alteração estrutural do músculo, que se reflete em sua capacidade de produção de força e desempenho neuromotor dos animais (BAYOL *et al.*, 2009). Os baixos níveis de transcrição dessas proteínas pode desencadear um mecanismo adaptativo, como a síntese de mais proteínas. A modificação do genótipo pode influenciar o aparecimento de um fenótipo compensatório, funcional, que traduz a capacidade plástica do músculo esquelético.

Ao desmame, há predominância de fibras tipo I no sóleo, que serão 70-80% da composição do músculo na vida adulta (PUNKT, NAUPERT & ASMUSSEN, 2004). A diminuição nos níveis de RNAm das miosinas I e IIa pode significar um aumento da expressão de fibras intermediárias - tipo IIx -, ou seja, um músculo com um perfil do tipo de fibra não definido aos 22 dias. Além disso, estudos afirmam que MyoD e miogenina podem estar envolvidos no estabelecimento e manutenção do fenótipo maduro de fibras musculares lentas e rápidas; miogenina é expressa em níveis altos em comparação com MyoD em músculo lentos, enquanto o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (HUGHES *et al.*, 1993; VOYTIK *et al.*, 1993; ALLEN *et al.*, 2001). Nossos resultados evidenciam uma redução extra de MyoD no músculo sóleo, o que comprova as repercussões da dieta materna no desenvolvimento muscular dos filhotes.

Nesse sentido, autores têm demonstrado que a gestação e lactação são os períodos mais importantes para o desenvolvimento de alterações permanentes no fenótipo muscular (BEDI *et al.*, 1982). Tais repercussões sobre o desenvolvimento estão associadas a uma reorganização estrutural e morfológica do músculo (PETTE & STARON, 2001). Há uma orquestrada mudança na expressão gênica e a transição entre os tipos de fibras inclui modificações nas diferentes isoformas (PETTE & STARON, 2001). De forma, os resultados do presente estudo mostram que as modificações no genótipo muscular implicaram no estabelecimento

de um perfil ainda imaturo de fibras. Então, a manipulação nutricional no período crítico tem efeito modulador na expressão desses genes que contribuem para manutenção de um perfil apropriado do músculo, tanto expressão dos fatores miogênicos, como na proporção do tipo de fibra.

Expressão gênica de proteínas contráteis em longo prazo

Sob o contexto de programação metabólica, em nossos achados a expressão gênica de proteínas do músculo esquelético foi modificada ao longo do tempo e de forma diferente em músculos com perfis contráteis e metabólicos diferentes. O músculo esquelético é um tecido heterogêneo que tem diferentes tipos de fibra que diferem na atividade de sua ATPase miofibrilar, propriedades contráteis e metabólicas (PUNKT, NAUPERT & ASMUSSEN, 2004). As fibras tipo I utilizam gordura como substrato energético. Em contraste, fibras tipo II utilizam glicose como fonte energética. As fibras tipo IIa possuem um misto de propriedade glicolítica e oxidativa, e as IIb são exclusivamente glicolíticas (BROOK *et al.*, 2016).

A expressão gênica das miosinas I e IIa foram aumentadas no sóleo aos 90 dias. No EDL, houve diminuição da expressão dos genes actina e miosina I. Aos 180 dias, os níveis de RNAm da actina, miosinas I e IIa foram maiores no sóleo, enquanto no EDL, a expressão gênica da miosina IIb diminuiu. Observa-se uma evolução diferente da resposta transcricional entre os diferentes músculos (MIZUNOYA *et al.*, 2013), e dependentes da idade (ESHIMA *et al.*, 2017). As mudanças que a dieta materna causou na expressão gênica das miosinas I e IIa no sóleo foram mais robustas, pois se mantiveram aos 90 e 180 dias. Por outro lado, as expressões dos genes actina e as miosinas no EDL foram variáveis com o tempo (LATOUCHE *et al.*, 2014).

Aos 90 dias, os níveis de RNAm podem significar um aumento da capacidade oxidativa no sóleo, além de um músculo com maior capacidade de sustentar as contrações musculares. No EDL, a expressão dos genes retrata uma diminuída capacidade contrátil e oxidativa. Como o metabolismo desse músculo rápido é predominantemente glicolítico, a diminuição da expressão gênica da miosina I confirma a adaptação do seu metabolismo à atividade da ATPase miofibrilar. No rato mais maduro, com 180 dias, a HFD aumentou os níveis de RNAm da actina e as

miosinas I e IIa continuam aumentadas no músculo sóleo. No EDL, aos 180 dias, as expressões gênicas das proteínas contráteis são equilibradas e semelhantes entre os grupos, porém a diminuição do RNAm da miosina IIb ressalta o decréscimo do metabolismo glicolítico.

Estudos prévios encontraram uma deposição aumentada de lipídios no músculo esquelético (COLLINO *et al.*, 2014; ROMERO *et al.*, 2014; KOMIYA *et al.*, 2017). O aumento do teor de lipídios dentro e ao redor das fibras musculares é uma manifestação de alteração do perfil metabólico muscular (KELLEY *et al.*, 2002). De fato, essa alteração na capacidade de armazenar e oxidar gorduras pode contribuir para a patogênese da síndrome metabólica e preceder o seu desenvolvimento (KELLEY *et al.*, 2002). O perfil do tipo de fibra muscular é um dos fatores que contribui para a síndrome metabólica. Ratos geneticamente modificados para ter uma maior quantidade de fibras rápidas mostraram resistentes à obesidade, mesmo após HFD (SUWA *et al.*, 2002). Animais que se tornaram obesos tiveram aumento semelhante das fibras tipo I e IIa, o que sugere um aumento da capacidade oxidativa global (SUWA, NAKAMURA, KATSUTA, 1999; IOSSA, 2002). Mizunoya *et al.* (2013) avaliaram a expressão de genes contráteis e metabólicos após a dieta rica em gordura e descreveram uma ativação do metabolismo oxidativo. Tais resultados confirmam o potencial de adaptação metabólica do músculo esquelético (KELLEY *et al.*, 2002).

Embora não se tenha encontrado dados similares na literatura para comparação, no presente estudo, a mudança da expressão gênica das proteínas parece ser o início de um acometimento metabólico. Em longo prazo, após a HFD no período crítico do desenvolvimento, os ratos apresentaram menor peso, não houve mudanças no perfil bioquímico, porém ocorreram modificações no genótipo do músculo. Deve-se ressaltar que esse tecido é conhecido por sua alta plasticidade, habilidade de adaptar o mecanismo de funcionamento frente a estímulos e seu papel na saúde metabólica (VERDIJK *et al.*, 2014). Assim, infere-se que a manipulação nutricional materna causou um “*metabolic imprinting*” no músculo dos filhotes em longo prazo capaz de modificar sua expressão gênica (WATERLAND e GARZA, 1999). Além disso, tais modificações foram permanentes no sóleo e dependentes ainda do tempo no EDL. Dessa forma, compreende-se que a remodelação da

expressão de genes – com aumento da capacidade contrátil e oxidativa - pode ter sido necessária para manutenção de um fenótipo apropriado e saúde metabólica dos animais. Além disso, a idade de 90 dias parece ser um período importante para o estabelecimento do perfil contrátil e oxidativo do músculo.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental do presente estudo mostrou que a HFD ofertada no período crítico provocou redução de peso e baixos níveis de triglicerídeos na prole ao desmame. No período pós-lactação, a HFD durante a gestação e lactação provocou diminuição ponderal nos filhotes, não houve modificações no perfil bioquímico do soro, nem intolerância à glicose em longo prazo.

Ademais, em curto prazo, houve diminuição da transcrição gênica de MyoD e proteínas contráteis no sóleo, mostrando que fator dietético provocou modulação transcricional do desenvolvimento muscular. Por outro lado, houve remodelação da expressão de genes de proteínas contráteis e também relacionadas ao metabolismo do músculo esquelético. Em longo prazo, verificou-se um aumento do RNAm da actina e miosinas I e IIa no sóleo, o que significa aumento da capacidade oxidativa global do músculo. A manipulação nutricional no período crítico causou um “*metabolic imprinting*” na prole e as modificações gênicas no músculo parecem ser o início de um acometimento metabólico. Tais mudanças do perfil genotípico refletem o potencial de adaptação do tecido muscular e aconteceram para a manutenção de um fenótipo funcional do músculo. Essa adequação gênica pode levar a mudanças persistentes na fisiologia muscular. Mais estudos utilizando este modelo experimental são necessários para melhor entendimento das origens do desenvolvimento de fenótipos associados à síndrome metabólica em ratos adultos. Pesquisas em longo prazo envolvendo os efeitos da dieta materna no desempenho neuromotor, capacidade de produção de força, expressão gênica e perfil do tipo de fibra muscular podem corroborar com os achados dos efeitos deletérios na idade adulta.

REFERÊNCIAS

1. AGBULUT, O. *et al.* Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. Biol Cell. v. 95, n. 6, p. 399-406. 2003.
2. AGUIAR, A. F. *et al.* Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. Int J Sports Med. v. 34, n. 4, p. 293-301. 2013.
3. AINGE, H.; THOMPSON, C.; OZANNE, S.E.; ROONEY, K.B. A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. Int J Obes. v. 35, n. 3, p. 325-335. 2011.
4. AKYOL, A.; LANGLEY-EVANS, S.C.; MCMULLEN, S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. Br J Nutr. v. 102, n.11, p. 1601-10. 2009.
5. AKYOL, A.; MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S.C. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. Br J Nutr. v. 107, n.7, p. 964-78. 2012.
6. ALBUQUERQUE, K. T. *et al.* Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. Nutrition. v. 22, n. 7-8, p. 820-829. 2006.
7. ALFARADHI, M.Z.; OZANNE, S.E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. Front Genet. v. 3, n.2, p. 27. 2011.
8. AL-HAZZAA, H. M. *et al.* Physical activity, sedentary behaviors and dietary habits among Saudi adolescents relative to age, gender and region. Int. J. Behave. Nutr. Phys. Act., v. 8, p.140, 2011.
9. ALHEIROS-LIRA, M.C. *et al.* Effects of high-fat diet on somatic growth, metabolic parameters and function of peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet. Brit J Nutri. v. 117, p. 796-803.
10. ALLEN, D. L. *et al.* Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. J Biol Chem. v. 276, n. 47, p. 43524-43533. 2001.
11. ANDREWS, J. L. *et al.* CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 107, n. 44, p. 19090-19095. 2010.

12. ASHINO, N.G. *et al.* Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. J Nutr Biochem. v. 23, n. 4, p. 341-348. 2012.
13. BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. J Appl Physiol. v. 90, n. 1, p. 345-357. 2001.
14. BARJOT, C. *et al.* Transformation of slow- or fast-twitch rabbit muscles after cross-reinnervation or low frequency stimulation does not alter the in vitro properties of their satellite cells. J Muscle Cell Motil. v. 19, n. 1, p. 25-32. 1998.
15. BARROS, K. M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. Nutr Neurosci. v. 9, n. 1-2, p. 99-104. 2006.
16. BARTON-DAVIS, E. R.; SHOTURMA, D. I.; SWEENEY, H.L. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. Acta Physiol Scand. v. 167, n. 4, p. 301-305. 1999.
17. BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. Cadernos de Saúde Pública, v.19, sup. 1, 2003.
18. BAYOL, S. *et al.* The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. Br J Nutr. v. 91, n. 3, p. 331-339. 2004.
19. BAYOL, S. A. *et al.* Evidence that a maternal "junk food" diet during pregnancy and lactation can reduce muscle force in offspring. Eur J Nutr. v. 48, n. 1, p. 62-65. 2009
20. BAYOL, S. A.; 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. J Physiol. v. 567, n. 3, p. 951-961. 2005.
21. BAYOL, S.A.; FARRINGTON, S.L., STICKLAND, N.C. A maternal "junk food" and a greater propensity for obesity in rat offspring. Br J Nutr. v. 98, n. 4, p. 843-851. 2007.
22. BAYOL, S.A. *et al.* A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring. Endocrinology. v.15, n. 4, p. 1451-1461. 2010.

23. BEDI, K.S. et al. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and re-fed adult animals. *Br J Nutr.* v. 47, n. 3, p. 417-431. 1982.
24. BENTZINGER, C. F.; VON MALTZAHN, J.; RUDNICKI, M. A. Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther.* v. 1, n. 3, p. 27. 2010.
25. BENTZINGER, C. F., Y. X. WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v. 4, n. 2. 2012.
26. BIELOHUBY, M. et al. Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 305, n. 9, p. 1059-1070. 2013.
27. BICKEL, C.S. et al. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol.* v.98, p. 482 – 488. 2005.
28. BOTTINELLI, R. et al. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v.15, n.4, 413-419, 1994.
29. BROOK, M. S. et al. Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. *Acta Physiol.* v. 216, n. 1, p. 15-41. 2016.
30. BROWN, L.D. Endocrine regulation of fetal skeletal muscle growth: impact on future metabolic health. *J Endocrinol.* v. 221, p. R13–R29, 2014.
31. BUCKELEY, A.J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism.* v. 54, n. 4, p. 500-507. 2005.
32. BUSCHER, D.; IZPISUA BELMONTE, J.C. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. *Cell Tissue Res.* v. 296, n. 1, p.131-139. 1999.
33. CABEÇO, L. C. et al. Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and myogenin expression in offspring. *J Mol Histol.* v. 43, n. 5, p. 461-471. 2012.

34. CABRERA, D. *et al.* Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with Sarcopenia and Decreased Serum Insulin-Like Growth Factor-1. Dig Dis Sci. v. 61, p. 3190-3198. 2016.
35. CAVALCANTE, T.C.F., LIMA DA SILVA, J.M.; DA MARCELINO DA SILVA, A.A. *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. Lipids. v. 48, p.1157–1168. 2013.
36. CESARETTI, M.L.R.; JUNIOR, O.K. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. v. 50, p.190-197. 2006.
37. CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev. v. 84, n. 1, p. 209-238. 2004.
38. CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; KIM, B. C. Influence of myosin heavy- and light chain isoforms on early postmortem glycolytic rate and pork quality. Meat Sci. v. 76, n. 2, p. 281-288. 2007.
39. CHOI, M-S. *et al.* High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. Brit J Nutr. v. 113, p. 867-877. 2015.
40. COLLINO, M. *et al.* Variability in Myosteatorsis and Insulin Resistance Induced by High-Fat Diet in Mouse Skeletal Muscles. BioMed Research International. v. 2014, p.1-10. 2014.
41. CORNELISON, D.D.; WOLD, B.J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol. v.191, n.2, p. 270-83. 1997.
42. CORPEleijn, E.; SARIS, W. H.; BLAAK, E. E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. Obes Rev. v.10, n. 2, p. 178-193. 2009.
43. CROEZEN, S. *et al.* Skipping breakfast, alcohol consumption and physical inactivity as risk factors for overweight and obesity in adolescents: results of the E-MOVO project. Eur J Clin Nutr. v. 63, n. 3, p. 405-412, 2009.
44. DA SILVA ARAGAO, R. *et al.* Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. Br J Nutr **112**(3): 328-337. 2014.

- 45.DAVIS, T. A. *et al.* Protein turnover in skeletal muscle of suckling rats. Am J Physiol. v. 257, n. 5, p.1141-1146. 1989.
- 46.DAENZER, M.; ORTMANN, S.; KLAUS, S.; METGES, C.C. Prenatal high protein exposure decreases energy expenditure and increases adiposity in young rats. J Nutr. v. 132, n. 2, p. 142-144. 2002.
- 47.DE BLASIO, M.J.; GATFORD, K.L.; MCMILLEN, I.C.; ROBINSON, J.S.; OWENS, J.A. Placental restriction of fetal growth increases insulin action, growth, and adiposity in the young lamb. Endocrinology. v.148, p. 1350 –1358. 2007.
- 48.DE BRITO ALVES, J. L. *et al.* Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. J Nutr Biochem. v.41, p. 117-123. 2017.
- 49.DE OLIVEIRA, C. *et al.* High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. Lipids Health Dis **10**: 11. 2011.
- 50.DESAI, M.; HALES, C.N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. Biol Rev Camb Philos Soc. v. 72, n.2, p. 328-348. 1997.
- 51.DEVLIN, R. B.; EMERSON, C. P. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. Cell. v. 13, n. 4, p. 599-611. 1978.
- 52.DI MASO, N.A.; CAIOZZO, V.J.; BALDWIN, K.M. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. American Journal of Physiology, v.278, n.4, p.1099-1106, 2000.
- 53.DOBHING, J. The effect of undernutrition on myelination in the central nervous system. Biol Neonat. v. 9, n. 1, p. 132-147. 1965.
- 54.D'SOUZA, D.M.; TRAJCEVSKI, K.E.; AL-SAJEE, D.; WANG, D.C.; THOMAS, M.; ANDERSON, J.E. *et al.* Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. Physiological Reports. v.3, n. 8, p. 1-12. 2015.

55. DUBE, J. J. *et al.* Effects of acute lipid overload on skeletal muscle insulin resistance, metabolic flexibility, and mitochondrial performance. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 307, n.12, p. 1117-1124. 2014.
56. DZIEDZIC, B. *et al.* Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. J Neuroendocrinol. v. 19, n. 5, p. 364-373. 2007.
57. ELAHI, M.M. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. British Journal of Nutrition. v.102, p. 514-519. 2009.
58. ESHIMA, H.; TAMURA Y.; KAKEHI, S.; KUREBAYASHI, N.; MURAYAMA, T.; NAKAMURA, K. *et al.* Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force on mouse fast-twitch skeletal muscle. Physiological Reports. v. 5, n.7, p.1-12. 2017.
59. ESTADELLA, D. *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. Nutrition. v. 20, n. 2, p. 218-224. 2004.
60. ESTADELLA, D. *et al.* A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. Lipids health dis. v.10, p.168, 2011.
61. FOURE, A. *et al.* Effects of plyometric training on both active and passive parts of the plantarflexors series elastic component stiffness of muscle-tendon complex. Eur J Appl Physiol. v. 111, n. 3, p. 539-548. 2011.
62. GAIVA, M. H. *et al.* Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. Br J Nutr. v. 86, n. 3, p. 371-377. 2001.
63. GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. Science. v. 305, n. 5691, p. 1733-1736. 2004
64. GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. Matern Child Nutr. v. 1, n. 3, p.130-141. 2005.
65. GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. Public Health Nutr. v. 4, n. 2, p. 611-624. 2001.
66. GROS, J. *et al.* A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature. v. 435, n. 7044, p. 954-958. 2005.

67. GROSSET, J. F. *et al.* Paired changes in electromechanical delay and musculo-tendinous stiffness after endurance or plyometric training. Eur J Appl Physiol. v.105, n. 1, p.131-139. 2009.
68. GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI MC, WRIGHT WE, BEILHARZ MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res. v. 267, n. 1, 1992, p.99-104. 1992.
69. GUNNING, P. W. *et al.* Alpha-skeletal actin induces a subset of muscle genes independently of muscle differentiation and withdrawal from the cell cycle. J Cell Sci. v. 114, n. 3, p. 513-524. 2001.
70. GUO, F.; JEN, C. High-Fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. Physiology & Behavior. v. 57, n. 4, p. 681-686, 1995.
71. GUSTAFSON, T.A.; MARKHAM, B.E.; MORKIN, E. Effects of thyroid hormone on α -actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. Circ. Res. v. 59, p.194-201. 1986.
72. GUTMAN, R. A. *et al.* Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. Metabolism. v. 36, n.11, p. 1013-1020. 1987.
73. HADDAD, F.; ADAMS, G. R. Selected contribution: Acute cellular and molecular responses to resistance exercise . J Appl Physiol. v.93, p.394- 403. 2002.
74. HAIRIRI, N.; THIBAULT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutr Res Rev. n. 23, 270-299. 2010.
75. HALES, C.N.; BARKER, D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis. British Medical Bulletin, v.60, p.5-20, 1992.
76. HALES, C.N.; OZANNE, S.E. The dangerous road of catch up growth. Journal of Physiology, v.547, p.5-10, 2003.
77. HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental origins of health and disease: moving from biological concepts to interventions and policy. Int J Gynaecol Obstet. v. 115, p.3-5. 2011.

78. HAUSMAN, D.B.; MCCLOSKEY, H.M.; MARTIN, R.J. Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. J Nutr. v. 121, n. 12, p. 1917-23. 1991.
79. 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.
80. HEGSTED, D. M. *et al.* Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. Am J Clin Nutr. v. 17, n. 5, p. 281-295. 1965.
81. HILL, J.O.; MELANSON, E.L.; WYATT, H.T. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. J. Nutr. v. 130, p. 284S-288S. 2000.
82. HO, K.W. *et al.* Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. J Embryol Exp Morphol. v. 76, n. 37-49. 1983.
83. HUANG, Y.; YE, T.; LIU, C.; FANG, F.; CHEN, Y.; DONG, Y. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. J. Biosci. v. 42, n. 2, p. 311–319. 2017.
84. HUGHES, S. M. *et al.* Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle. Dev Biol. v. 158, n. 1, p. 183-199. 1993.
85. HUGHES, S. M. *et al.* Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development. v. 118, n. 4, p. 1137-1147.
86. IANUZZO, D. *et al.* Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. Nature. v. 3; n. 270; p. 74-76. 1977.
87. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil 2009. Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica, número 25. 2009.
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indic_saude.pdf
88. IOSSA, S. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. Int J Obes Relat Metab Disord. v. 26, n. 1, p. 65-72. 2002.

89. IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. v. 231, p.597-600. 1986.
90. JOUNG, H. et al. Ret finger protein mediates Pax7 –induced ubiquitination of MyoD in skeletal muscle atrophy. *Cell Signal*. v. 26, n.10, p. 2240-2248. 2014.
91. KALBE, C. et al. Moderate high or low maternal protein diets change gene expression but not the phenotype of skeletal muscle from porcine fetuses. *Domest Anim Endocrinol*. v. 58, p. 63-75. 2017.
92. KARDON, G.; CAMPBELL, J.K.; TABIN, C.J. Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell*. v. 3, n. 4, p. 533-45. 2002.
93. KELLEY, D. E. et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. v. 51, n.10, p. 2944-2950. 2002.
94. KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N. A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel A (ed) *Myology*, 3rd edn. McGraw-Hill, pp 87:10, 2003.
95. KIM, J. Y. et al. High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 279, n. 6, p. 2057-2065. 2000.
96. KOMIYA, Y. et al. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. *J Muscle Res Cell Motil*. 2017.
97. KOZAK, R.; BURLET, A.; BURLET, C.; BECK, B. Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Development Brain Research*. v. 125, p. 75-82. 2000.
98. KRECHOWEC, S. O. et al. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol*. v. 189, n. 2, p. 355-363. 2006.
99. KUNZ, L.H.; KING, J.C. Impact of maternal nutrition and metabolism on health of the offspring. *Semin Fetal Neonatal Med*. v. 12, n. 1, p.71–77. 2007.
100. LAFUSTE, P. et al. ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell*. v. 16, n. 2, p. 861-870. 2005.

101. LAING, N. G. *et al.* Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). Hum Mutat. v. 30, n. 9, p. 1267-1277. 2009.
102. LATOUCHE, C. *et al.* Maternal overnutrition programs changes in the expression of skeletal muscle genes that are associated with insulin resistance and defects of oxidative phosphorylation in adult male rat offspring. J Nutr. v. 144, n. 3, p. 237-244. 2014.
103. LE GRAND, F.; RUDNICKI, M. A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. Curr Opin Cell Biol. v. 19, n. 6, p. 628-633. 2007.
104. LEPPER, C., T. A. PARTRIDGE, T. A.; FAN, C. M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Development. v. 138, n. 17, p. 3639-3646. 2011.
105. LEVINE, R. *et al.* The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. J Biol Chem. v. 179, n. 2, p. 985. 1949.
106. LIE, S. *et al.* Impact of periconceptional and preimplantation undernutrition on factors regulating myogenesis and protein synthesis in muscle of singleton and twin fetal sheep. Physiol Rep. v.3, n. 8. 2015.
107. LOWEY, S. *et al.* Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. J Mol Biol. v. 42, n. 1, p. 1-29. 1969.
108. LUCAS, C. A.; KANG, L. H.; HOH, J. F. Monospecific antibodies against the three mammalian fast limb myosin heavy chains. Biochem Biophys Res Commun. v. 272, n. 1, p. 303-308. 2000.
109. MATSAKAS, A. *et al.* Altered primary and secondary myogenesis in the myostatin-null mouse. Rejuvenation Res. v. 13, n. 6, p. 717-727. 2010.
110. MCDARLE, W.D; KATCH, F.I; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 6ª Ed. Guanabara Koogan, 2008.
111. MALTIN, C. A. *et al.* Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. Reproduction. v. 122, n. 3, p. 359-374. 2001.

112. MARSH, D.R.; CRISWELL, D.S.; CARSON, J.A.; BOOTH, F. W. Myogenic regulatory fac-tors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats . J Appl Physiol. v. 83, p.1270 – 1275. 1997.
113. MEHTA, S.H. Nutrition and pregnancy. Clin Obstet Gynecol. v. 51, n. 2, p. 409–418. 2008.
114. MIZUNOYA, W. *et al*. Dietary fat influences the expression of contractile and metabolic genes in rat skeletal muscle. PLoS One. n. 8, v. 11, 80152. 2103.
115. MORAES, J. C. *et al*. Hight-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. PLoS ONE., São Paulo, v. 4, n. 4, p. e5045, 2009.
116. MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev. v.26, n. 4, p. 471-483. 2002.
117. MORLEY, R.; DWYER, T. Fetal origins of adult disease? Clin Exp Pharmacol Physiol. v. 28, n. 11, p. 962-966. 2001.
118. MOTOHASHI, N.; ASAKURA, A. Muscle satellite cell heterogeneit and self-renewal. Front Cell Dev Biol. v.30, p. 2, n1, 1-11. 2014.
119. NABESHIMA, Y. *et al*. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. Nature. v. 364, n. 6437, p. 532-535. 1993.
120. NICOLAS, N.; GALLIEN, C. L.; CHANOINE, C. Analysis of MyoD, myogenin, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating *Xenopus* skeletal muscle. Dev Dyn. v. 207, n. 1, p. 60-68. 1996.
121. NOBACK, C. R.; EISENMAN , L. M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. Anat Rec. v. 201, n. 1, p. 67-73. 1981.
122. NORMAN, A. M. *et al*. Postnatal development of metabolic flexibility and enhanced oxidative capacity after prenatal undernutrition. Reprod Sci. v. 19, n. 6, p. 607-614. 2012.
123. OBEN, J.A.; MUORALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A.M.; MATHEWS, P.J.; MORGAN, M.L.; SOEDA, J. *et al*. Maternal obesity during pregnancy and

lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. Journal of Hepatology. v. 52, p. 913-920, 2010.

124. OERTEL, G. Morphometric analysis of normal skeletal muscles in infancy, childhood and adolescence. An autopsy study. J Neurol Sci. v.88, n. 1-3, p. 303-313. 1988.
125. OLIVEIRA, T. W. S. *et al.* A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. Lipids. v. 46, n. 11, p. 1071-1074. 2001.
126. OZANNE, S. E. *et al.* Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. J Endocrinol. v. 177, n. 2, p. 235-241. 2003.
127. PAIM, J.; TRAVASSOS, C.; ALMEIDA, C.; BAHIA, L.; MACINKO, J. The Brazilian health system: history, advances, and challenges. Lancet. 2011.
128. PANTALEÃO, L.C. *et al.* Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. Journal of Nutritional Biochemistry. v.24, p.1340–1348. 2013.
129. PERDIGUERO, E. *et al.* Epigenetic regulation of myogenesis. Epigenetics. v. 4, n. 8, p. 541-550. 2009.
130. PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. Histochem Cell Biol. v. 115, n. 5, p. 359-372. 2001.
131. PILEGGI, C.A. *et al.* Maternal conjugated linoleic acid supplementation reverses high-fat diet-induced skeletal muscle atrophy and inflammation in adult male rat offspring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v. 310, n. 5, p.R432-439. 2106.
132. PIMENTEL, G.D. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFkBp65 signaling in adult offspring. J Nutr Biochem. v. 23, n.3, p. 265-271. 2012.
133. PISANI, L. P. *et al.* Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life. Lipids Health Dis. v.7, n.13. 2008.

134. PISANI, L. P. *et al.* Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. Nutrition. v. 24, n. 3, p. 255-261. 2008.
135. PLATT, K.M.; CHARNIGO, R.J.; PEARSON, K.J. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. J. Dev. Orig Health Dis. v. 5, n. 3, p. 229-39. 2014.
136. PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. J Appl Physiol. v.95, p.1038 – 1044. 2003.
137. PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibers during development and ageing. Acta Histochemica, v. 106, n. 2; p. 145-154. 2004.
138. PURCELL, R.H. *et al.* Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. Physiol. Behav. v. 104, p. 474–479. 2011.
139. RAYNE, J.; CRAWFORD, G. N. Increase in fibre numbers of the rat pterygoid muscles during postnatal growth. J Anat. v. 119, n. 2, p. 347-357. 1975.
140. RIVERO, J.L.; TALMADGE, R.J.; EDGERTON, V.R. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil. v. 19, n. 7, p. 733-742. 1998.
141. ROMERO, M. *et al.* Treatment of rats with a self-selected hyperlipidic diet, increases the lipid content of the main adipose tissue sites in a proportion similar to that of the lipids in the rest of organs and tissues. PLoS One. v.9, n. 3, e90995. 2014.
142. ROSENDAL, L. *et al.* Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. J Appl Physiol. v. 93, n. 5, p. 1669-1675. 2002.
143. ROSINI, T. C.; SILVA, A. S.; MORAES, C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. Rev Assoc Med Bras. v. 58, n. 3, p. 383-387.

144. ROTHER, E. *et al.* Hypothalamic JNK1 and IKK β activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding. Endocrinology. v.153, 2012.
145. RUDNICKI, M. A.; JAENISCH, R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. Bioessays. v. 17, n. 3, p. 203-209. 1995.
146. RYALL, J. G. Metabolic reprogramming as a novel regulator of skeletal muscle development and regeneration. FEBS J. v. 280, n. 17, p. 4004-4013. 2013.
147. SAKAI, H. *et al.* Fetal skeletal muscle progenitors have regenerative capacity after intramuscular engraftment in dystrophin deficient mice. PLoS One. v. 8, n. 5, e63016. 2013.
148. SAMBASIVAN, R.; TAJBAKHSI, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. Semin Cell Dev Biol. v. 18, n. 6, p. 870-882. 2007.
149. SAMUELSSON, A.M. *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. Hypertension. v. 51, n. 2, p. 383-392. 2008.
150. SAYER, A. A., COOPER, C. Fetal programming of body composition and musculoskeletal development. Early Hum Dev. v. 81, n. 9, p. 735-744. 2005.
151. SCHIMIDT, M.I. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. In: VICTORA, C.G. *et al.* Saúde no Brasil: a série. The Lancet. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 61-74. 2011.
152. SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A. The potential of muscle stem cells. Dev Cell. v. 1, n. 3, p. 333-342. 2001.
153. SIEMELINK, M., A. *et al.* Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. Diabetologia. v. 45, n. 10, p. 1397-1403. 2002.
154. SILVA, A. P. *et al.* Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. Lipids. v. 41, n. 6, p. 535-541. 2006.

155. SRINIVASAN, M. *et al.* Maternal high-fat diet consumption results in fetal mal-programming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 291, p. 729-99. 2006.
156. SNOW, M.H. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.* v. 185, n. 3, p. 399-408. 1977.
157. SPANGENBURG, E. E.; BOWLES, D. K.; BOOTH, F. W. Insulin-like growth factor-induced transcriptional activity of the skeletal alpha-actin gene is regulated by signaling mechanisms linked to voltage-gated calcium channels during myoblast differentiation. *Endocrinology.* v.145, n. 4, p. 2054-2063. 2004.
158. STARON, R. S. *et al.* Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem.* v. 48, n. 5, p. 623-629. 2000.
159. STICKLAND, N. C. Muscle development in the human fetus as exemplified by m. sartorius: a quantitative study. *J Anat.* v.132, n. 4, p. 557-579. 1981.
160. SUN, B. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes.* v. 61, p. 2833–2841. 2012.
161. SUWA, K. *et al.* Co-existence of nemaline and cytoplasmic bodies in muscle of an infant with nemaline myopathy. *Neuropathology.* v. 22, n. 4, p. 294-298. 2002.
162. SUWA, M.; NAKAMURA, T.; KATSUTA, S. Muscle fibre number is a possible determinant of muscle fibre composition in rats. *Acta Physiol Scand.* v. 167, n. 3, p. 267-272. 1999.
163. TAJBAKHSI, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med.* v. 266, n. 4, p. 372-389. 2009.
164. TAKEUCHI, H.; MATSUO, T.; TOKUYAMA, K.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr.* v. 125, p. 920-925. 1995.
165. TAMAKI, T. *et al.* Limited myogenic response to a single bout of weight-lifting exercise in old rats. *Am J Physiol.* v. 278, p. C1143 – C1152. 2000.

166. THORLUND, J. B.; AAGAARD, P.; ROOS, E. M. Thigh muscle strength, functional capacity, and self-reported function in patients at high risk of knee osteoarthritis compared with controls. Arthritis Care Res. v.62, n. 9, p. 1244-1251. 2010.
167. TONG, J.F. Maternal obesity downregulates myogenesis and beta-catenin signaling in fetal skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 296, n. 4, p. 917-924. 2009.
168. TOSCANO, A. E.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. Nutrition. v.24, n. 3, p. 270-278. 2008.
169. VELLOSO, L.A. Maternal consumption of high-fat diet disturbs hypothalamic neuronal function in the offspring: implications for the genesis of obesity. Endocrinology. v. 153, n. 2, p. 543-545. 2012.
170. VERDIJK, L.B. *et al.* Satellite cells in human skeletal muscle: from birth to old age. Age. v. 36, n. 2, p. 545-7. 2014.
171. VICKERS, M. H. *et al.* Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., New Zealand, v. 285, n. 1, p. R271- R273, 2003.
172. VOYTIK, S. L. *et al.* Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. Dev Dyn. v. 198, n. 3, p. 214-224. 1993.
173. WANG, H., STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 282, n. 6, p. 1352-1359. 2002.
174. WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). Proc Natl Acad Sci USA, v. 83, n.5, p. 1388-92, 1989.
175. WILLOUGHBY, D. S.; NELSON, M. J. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. Med Sci Sports Exerc. v. 34, n. 8, p. 1262-1269. 2002.

176. WILSON, S. J.; ROSS, J. J.; HARRIS, A. J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. Development. v. 102, n. 4, p. 815-821. 1988.
177. YUSUF, F.; BRAND-SABERI, B. Myogenesis and muscle regeneration. Histochem Cell Biol. v. 138, n. 2, p.187-199. 2012.
178. ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. J Histochem Cytochem. v. 54, n. 11, p. 1177-1191. 2006.
179. ZAMMIT, P.S. *et al*. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res*. v. 15, n. 281, 39-49. 2002
180. ZHANG, K.; SHA, J.; HARTE, M. L. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. J Cell Biol. v. 188, n. 1, p. 39-48. 2010.
181. ZHU, L. N. *et al*. Effects of myogenin on muscle fiber types and key metabolic enzymes in gene transfer mice and C2C12 myoblasts. Gene. v. 532, n. 2, p. 246-252. 2013.
182. ZOU, T. D. *et al*. Mitochondrial biogenesis is decreased in skeletal muscle of pig fetuses exposed to maternal high-energy diets. Animal. v.11, n. 1, p. 54-60. 2017.
183. WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. v. 62, n. 2, p. 179-97. 1999.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL 1**Effects of a maternal High-Fat Diet on expression of genes controlling Skeletal Muscle Development and contraction proteins in weaning rat offspring**

Running title: Maternal high-fat diet delays muscle development and contraction in offspring

^{1*}Thaysa de Oliveira L. SOUZA; ²Rhowena Jane B. MATOS; ²Raquel DA SILVA ARAGÃO; ²Ana Elisa TOSCANO; ³Karla Mônica FERRAZ;

¹Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

²Department of Physical Education and Sports Science Academic Center of Vitoria (CAV), Federal University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antão, 55608-680, Brazil

^{3,1}Departament of Physical Therapy, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

Acknowledgements: This research was supported by the Pro-Rectorry of Research and Post-Graduation –UFPE (PROPESQ) and CAPES.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Number of words in abstract: 156

Number of words in manuscript: 3259

*Corresponding author: TOL SOUZA, thaysafisio@gmail.com

Effects of a maternal High-Fat Diet on expression of genes controlling Skeletal Muscle Development and contraction proteins in weaning rat offspring

Abstract

Introduction: perinatal nutritional disorders modify the programming of mechanisms related to the muscular growth and development. High-Fat Diets (HFD) are used as a model for studies about western feeding habits. **Methods:** Serum biochemical profile and real time PCR of the soleus and EDL (extensor digitorum longus) muscles of animals whose mothers consumed control diet (C, 14% fat) or HFD (H, 46% fat) during gestation and lactation. **Results:** both groups presented the same weight and biochemical profile during gestation and lactation. At weaning, H presented lower weight and decreased triglycerides. For gene expression, H exhibited a different profile in the soleus and EDL. In the soleus, there was a decrease in the expression of MyoD, actin, myosin I, IIa and IIb. There was no difference in the EDL gene expression. **Conclusions:** HFD decreased mRNA in the soleus. There was a delay in muscle development. Adaptations on gene expression may have been necessary for an appropriate muscle phenotype.

Keywords: Skeletal muscle. High-Fat Diet. Myogenic Regulatory Factors. Muscle fiber type. Critical period of development.

Introduction

The skeletal muscle is a plastic tissue capable of adapting to variations of the nutritional state through alterations of its size, metabolism and functional properties (1). The physiological and biochemical properties are determined during the muscular development (2). This tissue also can be affected on the offspring in response to maternal nutritional conditions, altering the phenotype on adulthood (3,4). Signs provided by the environment where the fetus is growing have the main role in the specification of the muscle fiber (5). Besides, the events defining the skeletal muscle functional properties prolong until the end of the neonatal period (6).

Muscle genotype and phenotype changes are regulated by different mechanisms (7-9), including myogenic regulatory factors (MRFs), which compose a group of transcriptional factors capable of controlling the expression of muscle-specific genes (10). The MRFs are composed by myogenic differentiation (MyoD), myogenin, myogenic factor 5 (Myf5) and MRF4. These genes have crucial functions in the fetal muscle development and regulate the muscle growth during the post-natal period. The MyoD is indispensable to skeletal myoblasts proliferation (11), while myogenin is fundamental for fetal muscle differentiation and may have an analog function on satellite cells during the postnatal period of the muscle (12-13). Researchers have been suggesting that the MyoD and myogenin may be involved in the establishment and maintenance of the slow and fast phenotype of the muscle fibers (10).

The interactions between actin and the various myosin forms on different fiber types are the generators of the contraction force of the muscle (14). The muscles with predominant type I fibers, like soleus, are able to perform sustained and tonic contractions, as happens on the postural control. The EDL (extensor digitus longus) is mainly composed by myosin type IIb, IIx – intermediate – and IIa (15). The myosin isoforms are related to phenotype differences of the contractile and metabolic properties besides the size and type of muscle

fibers (16). Furthermore, studies with rats showed that during the postnatal development of the muscle, the expression of these genes could be modified, while the occurrence of nerve maturation, growth, and remodeling of the muscular tissue is occurring (10,17).

The nutrient availability during the fetal and early postnatal period is determinant for the organism growth and muscular function (1,4,18-20). Maternal and neonatal nutritional disorders cause not only growth alterations but also regulate biochemical mechanisms related to the control of the development of musculoskeletal fibers (12). High fat diets (HFD), which reflects the current western feeding habits, during critical periods, have been related to the regulation of the weight of the babies, alterations of the glycemic and lipid profile, dysfunctions of the hepatic metabolism, higher storage of intramyocellular lipids, repercussions on the skeletal muscle development, as well as decrease of muscle strength (8, 21-15).

The effects of HFD during pregnancy and lactation over the gene expression related to the development of the muscular tissue and contractile function of a rat offspring are still barely described. Studies performed on swine indicated a negative regulation of the myogenesis (26,27). Other studies highlighted the impact of the maternal diet finding muscle fiber atrophy and modifications of contractile and metabolic factors (8,23,27-30). Therefore, considering the plasticity concepts, it is necessary to comprehend the expression of myogenic and contractile RNAm transcriptional factors, aiming to elucidate questions about the genotype repercussions of an HFD during pregnancy and lactation.

Methods

Animals and lab conditions

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences Centre (protocol no. 23076.050504/2013-15), Federal University of Pernambuco,

Recife, PE, Brazil, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (31).

A number of 10 female rats, albino, nulliparous of *Wistar* lineage, weighing between 220 and 280g, originated from the colony of the Nutrition Department of the Federal University of Pernambuco were used. The animals were maintained in bioterium under a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12-hour dark and light schedule (light period from 18:00h to 6:00h), kept on prolipropilen cages with free access to food and water. The female rats were mated for a ratio of 1:2 male and female. After the pregnancy confirmation through vaginal swab, the rats were divided into two groups according to the diet: Control (C, rats that received standard diet Nuvilab®, CR1, Brazil, during gestation and lactation, $n= 6$) and Hyperlipidemic (H, rats that received a hyperlipidemic diet during gestation and lactation, $n= 4$). On the first postnatal day, the litters were adjusted to eight rat cubs each. When the litter had insufficient male rats, the number was completed with female rats. During lactation, the mothers kept following the experimental diet. During the weaning (21 days) only the male rat cubs remained. The nutritional manipulation occurred during the pregnancy and lactation periods (32). The hyperlipidemic diet was composed by the standard feed (Nuvilab®, CR1, Brazil), enriched with raw peanut, milk chocolate, and sweet cookies on a proportion of 3:2:2:1 (33,34). The centesimal composition of the feed is presented in Table 1.

[insert table 1 near here]

Weight assessment

The weight from the female rats was measured during the pregnancy period on the 1°, 7°, 14° and 20° days. In the rat cubs, the assessment was made through the 1°, 7°, 14° and 21° days during lactation. The measurements were performed using an electronic weighing scale (Marte, model BL3200H with sensibility of 0,01 g). The obtained data were used to calculate

the percentage of body weight gain (BWG) through the following formula: $\%BWG = [\text{final body weight (g)} \times 100 / \text{initial weight (g)}] - 100$ (7).

Sacrifice and sampling

The male rat cubs were sacrificed by beheading in the 22^o day of life, between seven and eight in the morning, after 12h fasting. Blood from the rat's trunk was collected and centrifuged at 3500 rpm for 20min to obtain serum. For the gene expression analysis, the soleus and EDL muscles were carefully dissected and placed on sterile cryogenic tubes, immediately frozen in dry ice and kept at -80°C until the analysis.

Assessment of glycaemia and lipid profile of the rat cubs

Serum glucose, triglycerides and total cholesterol levels were measured with commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil), using a spectrophotometer Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific™), following the producer instructions. All the analysis were double made (34).

Analysis of gene expression of myogenic and contractile proteins through real time PCR

The real time PCR experiment was performed using the samples of the soleus and EDL muscles, following the stages briefly describe ahead. The method consists of 3 stages: 1) extraction of total RNA; 2) conversion of RNA into cDNA and 3) amplification of the polymerase chain reaction. The total RNA was extracted using 1 ml of the Trizol reagent (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) with a homogenizer (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). The isolation process of the total RNA was performed following the protocol suggested by the Invitrogen[®] producer and, subsequently, the quantity and quality of the purified RNA was evaluated using the spectrophotometer NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Next, the RNA samples were treated with a gDNA Wipeout solution

(Qiagen[®], Hilden, Germany) with the aim of efficiently remove the contamination of genomic DNA during 2 min at 42°C and then stored on ice. Posteriorly, a reverse transcription of 2 micrograms of RNA purified with cDNA was performed using the reverse transcription kit QuantiTect (Qiagen[®], Hilden, Germany), at 42°C during 15 minutes. The enzyme was inactivated at 95°C during 3 minutes. The preparation of cDNA was stored at -20°C until the time of its utilization.

Posteriorly, 5 ml of each cDNA diluted sample was utilized as a *template* for the amplification of real time PCR, using SYBR Green (Qiagen[®], Hilden, Germany) as intercalating fluophore. The real time PCR detection system was Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen[®], Hilden, Germany). The PCR parameters were: the first stage of initial denaturation during 5 minutes at 95°C followed by 45 cycles of 5s at 95°C and 10s at 60°C. The oligonucleotides or “primers” used for amplification are presented in Table 2.

[insert table 2 near here]

The cycle threshold (CT) values were determined by the normalization from the fluorescence curves versus the number of PCR cycles during the exponential amplification. The standard curves for all the primer amplifications (or oligonucleotides) were generated by plotting the mean values of CT according to the logarithm of the number of template molecules. All the quantifications were normalized to the reference gene (or *house-keeping*): *dehydrogenase glyceraldehyde-3-phosphate* (GAPDH). The value of the relative quantification of each target gene was analyzed using a comparative CT method (35). The formula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate the relative quantity of the transcript in the sample and normalized with the GAPDH endogenous reference.

Statistical analysis

The data was analyzed through the software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Initially, the normality test Kolmogorov-Smirnov was performed for all the analysis. After the confirmation of the normality, for the maternal body weight during pregnancy, as well as weight and percentual weight gain of the rat cubs, the ANOVA two-way statistical test was used performing repeated measures (factors: diet and time) with post-test of Bonferroni. In relation to the gene expression, the test was the t Student. The values are presented in mean and standard deviation. The significance level adopted was $\alpha < 0,05$ for all the analyses.

Results

Weight evolution of the pregnant rats

No differences were observed in the body weight of the female rats during all the gestational period (1st day: C = $224,2 \pm 7,93g$, n=6 vs. H = $228,5 \pm 12,23g$, n=4; $p > 0,05$; 7th day: C = $248,1 \pm 9,91g$, n=6 vs. H = $252,7 \pm 23,10g$, n=4; $p > 0,05$; 14th day: C = $272,7 \pm 24,25g$ vs. H = $290,9 \pm 50,49g$, n=4; $p > 0,05$; 20th day: C = $311,7 \pm 38,09g$, n=6 vs. H = $327,4 \pm 49,34g$, n=4; $p > 0,05$).

Weight evolution of the rat cubs

During lactation, the body weight did not show differences among the groups when assessed on the 1st, 7th and 14th days of life, but the rat cubs from the H group presented lower weight at 21 days of life (1st day: C = $6,98 \pm 0,91g$, n=46 vs. H = $6,67 \pm 1,97g$, n=35; $p > 0,05$; 7th day: C = $15,49 \pm 1,73g$, n=46 vs. H = $15,65 \pm 4,39g$, n=35; $p > 0,05$; 14th day: C = $26,73 \pm 3,89g$, n=46 vs. H = $27,26 \pm 4,38g$, n=35; $p > 0,05$; 21st day: C = $42,71 \pm 5,86g$, n=46 vs. H = $38,28 \pm 5,03g$, n=35; $p < 0,01$) (Figure 1A).

The percentage of weight gain, assessed from the 1st to 21st postnatal day was similar on the intervals between 1-7 days and 7-14 days. Nevertheless, there was a 68,73% decrease between the 14th and 21st days on the rat cubs from the mothers of the HFD diet (1st-7th day: C= 125, 1 ± 33,97%, n=46 vs. H= 136,1 ± 27,18%, n=35; p>0,05; 7th-14th day: C= 73,30 ± 22,55%, n=46 vs. H=74,35 ± 13,14% n=35, p>0,05; 14th-21st day C= 60,41 ± 11,06%, n=46 vs. H= 41,52 ± 13,62%, n=35; p<0,01) (Figure 1B).

[insert figure 1 near here]

Serum glycaemia and lipid profile of the rat cubs

The triglyceride levels showed a decrease of the cubs from the H group on 22 days. The glycaemia and total cholesterol were similar between the groups (Table 3).

[insert table 3 near here]

Gene expression of the myogenic factors and contractile proteins

Regarding the soleus muscle, there was a decrease of approximately 39% of the RANm expression from the MyoD, 30% of actin RNA, 15% from the gene expression of myosin I and 57% on the expression of the myosin IIa gene. There was no difference in the expression of the RNAm from myogenin and myosin IIb between the groups (MyoD: C= 1,028 ± 0,27; n=5 vs. H= 0,40 ± 0,06, n=5, p=0,001; Myogenin: C= 1,02 ± 0,22; n=4 vs. H= 1,04 ± 0,32; n=4, p=0,91, Acta 1: C= 1,02 ± 0,22, n=3 vs. H= 0,31 ± 0,14, n= 4, p=0,0036; MHC1: C= 1,02 ± 0,23, n=4 vs. H= 0,15 ± 0,05, n=4, p=0,0004; MHCIIa: C= 1,02 ± 0,21, n=4 vs. H= 0,58 ± 0,19, n=4, p=0,02; MHCIIb: C= 1,18 ± 0,70, n=4 vs. H= 0,38 ± 0,37, n=4, p= 0,09) (Figure 2).

[insert figure 2 near here]

The EDL muscle showed no difference in the assessed gene expression (MyoD: C= $1,04 \pm 0,31$; n=4 vs. H= $3,18 \pm 2,92$; n=5, p=0,008; Myogenin: C= $1,66 \pm 0,62$; n=5 vs. H= $2,51 \pm 2,37$; n=5, p=0,25; Acta 1: C= $1,33 \pm 0,565$, n=4 vs. H= $0,91 \pm 0,56$, n= 5, p=0,58; MHC1: C= $1,07 \pm 0,44$, n=4 vs. H= $1,130 \pm 0,47$, n=3, p=0,87; MHCIIa: C= $1,06 \pm 0,42$, n=3 vs. H= $1,15 \pm 0,98$, n=3, p=0,88; MHCIIb: C= $1,1 \pm 0,52$, n=5 vs. H= $1,16 \pm 0,45$, n=4, p=0,84) (Figure 3).

[insert figure 3 here]

Discussion

Previous studies have been showing that nutritional manipulation during the critical development period promotes physiological and metabolic modifications of the organism as a strategy to survival and development (36-38). These changes are characterized by weight gain, alterations of food intake, metabolic disorders, hormonal dysfunction, and muscular function (29, 30, 39-41).

Corroborating with previous studies, our results showed that rat cubs submitted to an HFD during gestation and lactation did not show differences in weight nor the biochemical profile during lactation (21, 23, 42). Besides that, the maternal diet did not provoke weight gain in the mothers, just like is documented in the literature (22, 24, 41). However, there are reports showing that a maternal diet enriched with fat can incite increased weight in the mothers and in the rat offspring (39, 43, 44). On the other hand, studies reported a low weight at birth of rat cubs after an HFD during gestation and lactation (25, 45). The divergent results may happen due to differences in the experimental diets used in the experiments, mainly in relation to macro nutrient proportions of carbohydrates, lipids, and proteins (34, 41).

Our results showed, at weaning, lighter weight and lower levels of triglycerides of the cubs which the respective mother receiving a hyperlipidemic diet during pregnancy and lactation. Previous studies justify the lighter weight by a decreased diet ingestion (34, 41). This decrease can be attributed to the high energy density of the HFD. Diets that contain 30% or more of energy originated from lipids induct satiety in rodents because of an increased energy consumption and efficiency of energetic storage (46, 47). Besides that, the thermogenesis caused by the diet can influence the food intake in animals submitted to the HFD (48).

Studies have been showing that the maternal diet can influence the maturation of morphological and functional patterns of the cubs (49, 50). The results from the present study evidenced changes on transcription of genes responsible for myogenesis regulation and contractile function of the offspring. Our data showed that the RNAm expression of MyoD, actin, myosin I and IIa were diminished in the soleus muscle of the H group at 22 days. Regarding the EDL, the gene expression was not modified by the diet. There is a different regulation of the myogenic and contractile genes from the slow and fast muscle types (28). In fact, other authors highlight the necessity to consider that those muscles have differences in their contractile and metabolic characteristics (51) and myogenic processes (52).

MyoD is marked by its capacity of transforming a variety of types of cells in myoblasts during the myogenesis and have an important function as a regulator of muscular cell formation and tissue specification during development (53). Moreover, it is a myogenic factor detected on active satellite cells (54, 55). The results of the present study reflect a decreased level of MyoD gene expression, which can mean a reduction of the cellular differentiation potential and a decrease of the satellite cell activity in the soleus muscle of the cubs at 22 days.

Such data are agreeing with the literature, showing an inadequate development of satellite cells at weaning in response to HFD, as well as a low responsiveness to IGF-I (Insulin Growth Factor I), which is associated with the process of gene activation, signaling an increase in contractile protein transcription (29,41). In addition, they may indicate a decrease in the proliferative phase of myogenesis (27). At this age, the satellite cells are with an intense functional activity. The negative myogenesis regulation may delay the process of the soleus muscular development, meaning a postponement of the muscle maturation and differentiation (26, 27). Other studies using HFD during gestation and lactation also reported delay on the cub's muscular development (8, 29, 30). Pantaleão *et al.* (2013) (56) also referred a decreased activity of mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) and reduced muscle development at 21 days.

The gene expression of the contractile proteins was diminished at the soleus muscle in the group H. Previous studies found muscle atrophy and reduction of the muscular cells proliferation rate at weaning (8, 30). The RNAm level of contractile proteins can mean structural alterations of the muscle, reflecting its capacity of strength production and neuromotor performance of the animals (40). The low transcriptional levels of these proteins can initiate an adaptive mechanism, like the synthesis of more proteins. The genotype modification may influence the arising of a functional compensatory phenotype, proving the plastic capacity of the skeletal muscle.

At weaning, there is a predominance of type I fibers in the soleus, which will be 70-80% of muscle composition in adult life (6). The decrease in myosin I and IIa mRNA levels may signify an increase in the expression of intermediate fibers - type IIx -, in other words, a muscle with a fiber type profile not defined at 22 days. In addition, studies report that MyoD and myogenin are related to a mature profile of slow and fast muscle fibers: myogenin is

expressed at high levels compared to MyoD in slow muscle, whereas the opposite is true for fast muscles (10, 57, 58). Our results evidenced an extra reduction of MyoD in the soleus muscle, which proves the repercussions of the maternal diet on the muscular development of the rat cubs.

In this sense, authors have demonstrated that gestation and lactation are the most important periods for the development of permanent changes in muscle phenotype (59). These development repercussions are associated with a structural and morphological reorganization of the muscle (60). There is an organized change on the gene expression and the transition between the fiber types include modifications on the different isoforms (60). Thus, the results from the present study reported that modifications in the muscle genotype implied on the establishment of an immature fiber profile. Therefore, nutritional manipulation on the critical period may have a modulating effect on the gene expression, that contribute to the maintenance of an appropriate muscle profile, either for the expression of a myogenic factor or the ratios of fiber types.

In conclusion, the HFD offered in the critical period caused weight reduction and low levels of triglycerides in the offspring at weaning. In addition, there was a decrease in MyoD gene transcription and contractile proteins in the soleus, showing that dietary factor caused transcriptional modulation of muscle development. It is suggested that such gene adaptation is necessary to maintain a functional muscle phenotype. This gene adequacy can lead to persistent changes in muscle physiology. Further research is needed to evaluate the consequences of this type of diet, for the offspring, in the long-term. Long-term research involving the effects of maternal diet on neuromotor performance, the capacity of strength production, gene expression, and muscle fiber type profile may corroborate findings of deleterious effects in adulthood.

References

1. MATSAKAS, A. *et al.* Altered primary and secondary myogenesis in the myostatin-null mouse. Rejuvenation Res. v. 13, n. 6, p. 717-727. 2010.
2. BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. Curr Opin Genet Dev. v. 11, n. 4, p. 440-448. 2001.
3. LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. Curr Opin Cell Biol. v. 19, n.6, p. 628-633. 2007.
4. BRAMELD, J. M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. Br J Nutr. v. 91, n.3, p. 327-328. 2004.
5. KNAPP, J. R. *et al.* Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. Development. v. 133, n. 4, p. 601-610. 2006.
6. LAING, N. G. *et al.* Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). Hum Mutat. v. 30, n. 9, p. 1267-1277. 2009.
7. ZIERATH, J.R.; HAWLEY, J.A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. PLOS Biol. v.2, n. 10, p. 1523-1527. 2004
8. RIVERO, J.L.; TALMADGE, R.J.; EDGERTON, V.R. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. J.Muscle Res Cell Motil. v. 19, n. 7, p. 733-742, 1998.
9. HUGHES, S. M. *et al.* Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." Development. v. 118, n. 4, p. 1137-1147. 1993.
10. AGUIAR, A. F. *et al.* Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. Int J Sports Med. v. 34, n. 4, p. 293-301. 2013.
11. BARROS, K. M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. Nutr Neurosci. v. 9, n. 1-2, p. 99-104. 2006.
12. TOSCANO, A. E.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. Nutrition. v.24, n. 3, p. 270-278. 2008.

13. HERRERA E.; ORTEGA-SENOVILLA H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. Current pharmaceutical biotechnology. v. 15, n. 1, p. 24-31. 2014.

14. ESHIMA, H.; TAMURA Y.; KAKEHI, S.; KUREBAYASHI, N.; MURAYAMA, T.; NAKAMURA, K. *et al.* Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force on mouse fast-twitch skeletal muscle. Physiological Reports. v. 5, n.7, p.1-12. 2017.

15. GUO, F.; JEN, C. High-Fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. Physiology & Behavior. v. 57, n. 4, p. 681-686, 1995.

16. KOZAK, R.; BURLET, A.; BURLET, C.; BECK, B. Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. Development Brain Research. v. 125, p. 75-82. 2000.

17. BAYOL, S. A.; 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. J Physiol. v. 567, n. 3, p. 951-961. 2005.

18. PISANI, L. P. *et al.* Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. Nutrition. v. 24, n. 3, p. 255-261. 2008.

19. OBEN, J.A.; MUORALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A.M.; MATHEWS, P.J.; MORGAN, M.L.; SOEDA, J. *et al.* Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. Journal of Hepatology. v. 52, p. 913-920, 2010.

20. HUANG, Y.; YE, T.; LIU, C.; FANG, F.; CHEN, Y.; DONG, Y. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. J. Biosci. v. 42, n. 2, p. 311–319. 2017.

21. KALBE, C. Moderate high or low maternal protein diets change gene expression but not the phenotype of skeletal muscle from porcine fetuses. Domest Anim Endocrinol. v. 58, p. 63-75. 2017.

22. ZOU, T. D. *et al.* Mitochondrial biogenesis is decreased in skeletal muscle of pig fetuses exposed to maternal high-energy diets. Animal. v.11, n. 1, p. 54-60. 2017.

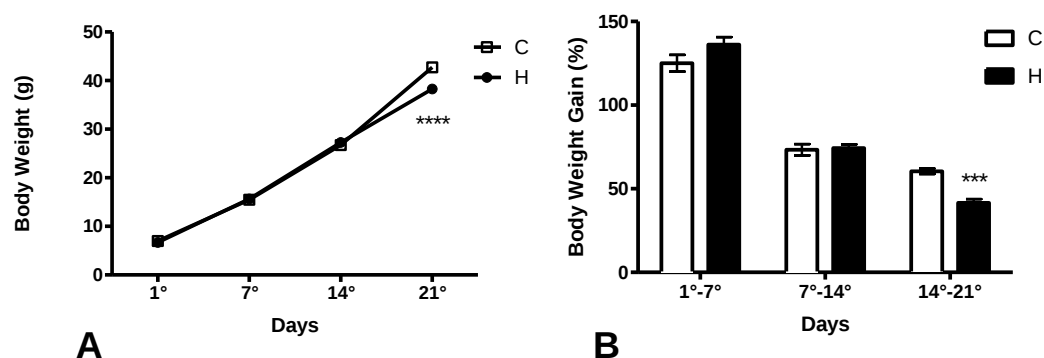
23. MIZUNOYA, W. *et al.* Dietary fat influences the expression of contractile and metabolic genes in rat skeletal muscle. PLoS One. n. 8, v. 11, 80152. 2103.
24. D'SOUZA, D.M.; TRAJCEVSKI, K.E.; AL-SAJEE, D.; WANG, D.C.; THOMAS, M.; ANDERSON, J.E. *et al.* Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. Physiological Reports. v.3, n. 8, p. 1-12. 2015.
25. PILEGGI, C.A. *et al.* Maternal conjugated linoleic acid supplementation reverses high-fat diet-induced skeletal muscle atrophy and inflammation in adult male rat offspring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.310, p. R432–R439. 2016.
26. BAYNE, K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. v. 39, n.4, p. 208–211. 1996.
27. OLIVEIRA, T. W. S. *et al.* A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. Lipids. v. 46, n. 11, p. 1071-1074. 2001.
28. ESTADELLA, D. *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. Nutrition. v. 20, n. 2, p. 218-224. 2004.
29. BAYOL, S. *et al.* The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. Br J Nutr. v. 91, n. 3, p. 331-339. 2004.
30. ALHEIROS-LIRA *et al.* Effects of high-fat diet on somatic growth, metabolic parameters and function of peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet. British Journal of Nutrition. v.117, p. 796-803. 2017.
31. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods. v. 25, p. 402–8. 2001.
32. BARKER, D.J. The developmental origins of adult disease. European Journal of epidemiology, v. 18, n.8, p. 733-736, 2003.
33. GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. Matern Child Nutr. v. 1, n. 3, p.130-141. 2005.
34. OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. Nature, v. 427, n. 6973, p.411-412. 2004.

35. DE BLASIO, M.J.; GATFORD, K.L.; MCMILLEN, I.C.; ROBINSON, J.S.; OWENS, J.A. Placental restriction of fetal growth increases insulin action, growth, and adiposity in the young lamb. Endocrinology. v.148, p. 1350 –1358. 2007.
36. BAYOL, S. A. *et al.* Evidence that a maternal "junk food" diet during pregnancy and lactation can reduce muscle force in offspring. Eur J Nutr. v. 48, n. 1, p. 62-65. 2009.
37. CAVALCANTE, T.C.F., LIMA DA SILVA, J.M.; DA MARCELINO DA SILVA, A.A. *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. Lipids. v. 48, p.1157–1168. 2013.
38. PLATT, K.M.; CHARNIGO, R.J.; PEARSON, K.J. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. J. Dev. Orig Health Dis. v. 5, n. 3, p. 229-39. 2014.
39. BAYOL, S.A. *et al.* A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. Endocrinology. v. 151, n. 4, p. 1451-61. 2010.
40. LATOUCHE, C. *et al.* Maternal overnutrition programs changes in the expression of skeletal muscle genes that are associated with insulin resistance and defects of oxidative phosphorylation in adult male rat offspring. J Nutr. v. 144, n. 3, p. 237-244. 2014.
41. AKYOL, A.; LANGLEY-EVANS, S.C.; MCMULLEN, S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. Br J Nutr. v. 102, n.11, p. 1601-10. 2009.
42. HILL, J.O.; MELANSON, E.L.; WYATT, H.T. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. J. Nutr. v. 130, p. 284S-288S. 2000.
43. HAIRIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutr Res Rev. n. 23, 270-299. 2010.
44. TAKEUCHI, H.; MATSUO, T.; TOKUYAMA, K.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Dietinduced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. J Nutr. v. 125, p. 920-925. 1995.
45. KUNZ, L.H.; KING, J.C. Impact of maternal nutrition and metabolism on health of the offspring. Semin Fetal Neonatal Med. v. 12, n. 1, p.71–77. 2007.

46. MEHTA, S.H. Nutrition and pregnancy. Clin Obstet Gynecol. v. 51, n. 2, p. 409–418. 2008.
47. DAVIS, T. A. *et al.* Protein turnover in skeletal muscle of suckling rats. Am J Physiol. v. 257, n. 5, p.1141-1146. 1989.
48. KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N. A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel A (ed) *Myology*, 3rd edn. McGraw-Hill, pp 87:10, 2003.
49. PERDIGUERO, E. *et al.* Epigenetic regulation of myogenesis. Epigenetics. v. 4, n. 8, p. 541-550. 2009.
50. GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI MC, WRIGHT WE, BEILHARZ MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res. v. 267, n. 1, 1992, p.99-104. 1992.
51. CORNELISON, D.D.; WOLD, B.J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol. v.191, n.2, p. 270-83. 1997.
52. PANTALEÃO, L.C. *et al.* Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. Journal of Nutritional Biochemistry. v.24, p.1340–1348. 2013.
53. PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibers during development and ageing. Acta Histochemica, v. 106, n. 2; p. 145-154. 2004.
54. VOYTIK, S. L. *et al.* Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. Dev Dyn. v. 198, n. 3, p. 214-224. 1993.
55. ALLEN, D. L. *et al.* Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. J Biol Chem. v. 276, n. 47, p. 43524-43533. 2001.
56. BEDI, K.S. *et al.* Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refeed adult animals. The British Journal of Nutrition. v. 47, n.3, p. 417-31. 1982.
57. PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. Histochem Cell Biol. v. 115, n. 5, p. 359-372. 2001.

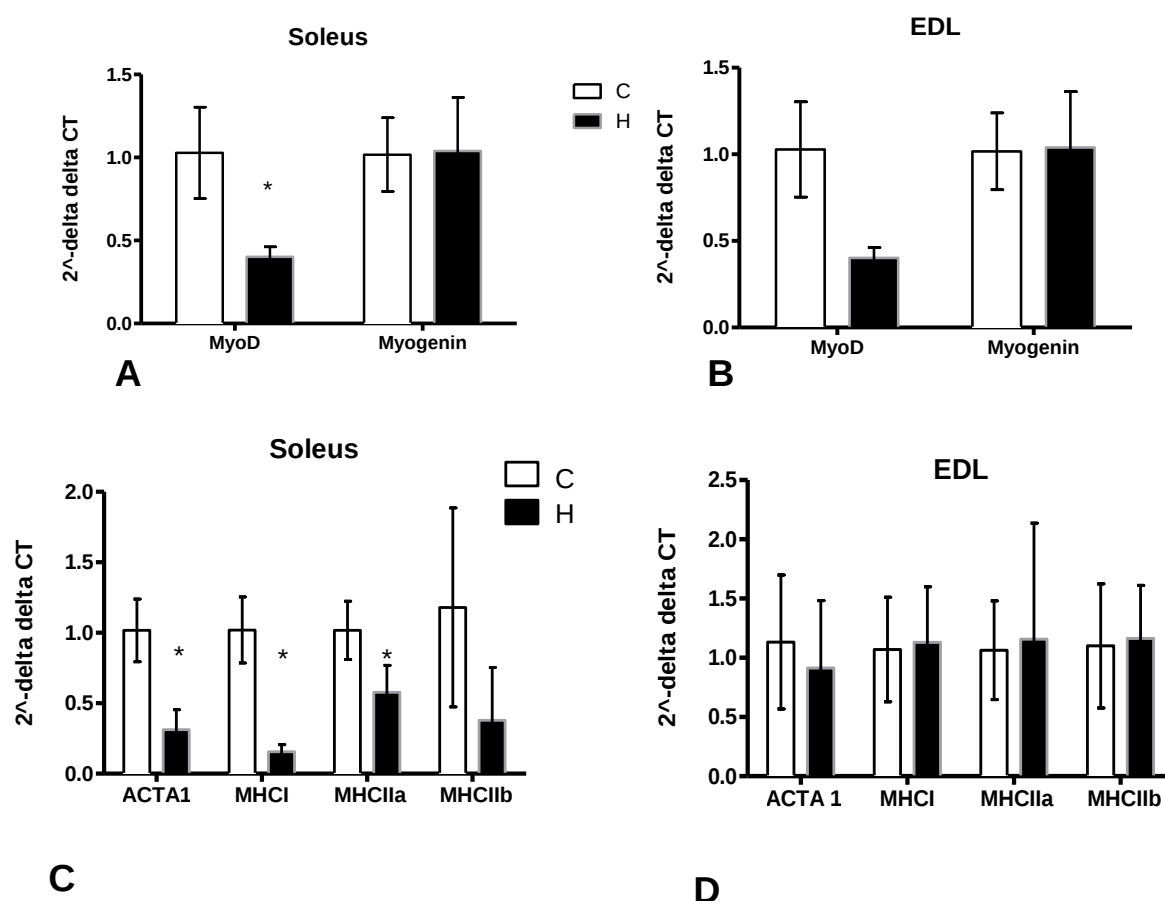
Figures

Figure 1. Body weight, percentage of body weight gain of offsprings during lactation (A,B).



Body weight during lactation (A), percentage of body weight gain of offsprings during lactation (B). Groups: C = control, (n=46; B); H = high-fat diet, (n=35; C). Data are means $\pm$ SD. Two way ANOVA test followed by Bonferroni post hoc, *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Figure 2. Relative amount of muscle soleus and EDL mRNA MyoD, Myogenin, ACTA 1, Myosin I, Ila, and IIb in offsprings at 22 days.



The pairs of columns represent the expression of mRNA relative levels of MyoD, Myogenin, ACTA 1, MHC I, IIa and IIb in soleus and EDL muscles to endogenous GAPDH amplified in the same sample under the same experimental conditions. (A: Soleus MyoD and Myogenin; B: EDL MyoD and Myogenin; C: Soleus ACTA 1, MHC I, IIa and IIb; D: EDL ACTA 1, MHC I, IIa and IIb). Each pairs of columns represents MD ± SD of 2 different samples of mRNA. The analyses were made in triplicates and there was less than 5% variation among the values obtained, t test.

Tables

Table 1. Chemical composition of standard chow and high-fat diet used in the experiments.

Chemical composition	Standard chow* (g/100g)	High-Fat Diet (g/100g)
Carbohydrate	47,76	38,08
Protein (N x 6,25)	28,85	27,24
Lipids	5,63	25,37
Ashes	7,91	4,88
Humidity and volatile substances	9,85	4,43
Total energy (Kcal/100g)	357,11	489,61
Carbohydrate (%VET)	53,50	31,11
Protein (%VET)	32,31	22,26
Lipid (%VET)	14,19	46,63

The centesimal composition was analyzed at the Laboratory of Food Analysis/UFPE.

*Nuvilab ®, CR1, Brasil.

Table 2. Primers used for amplification.

Gene	Foward Primer	Reverse Primer
<i>myod</i>	ACTCTGCTTCTCCTCCTG	TTCTCACATCTGGCTTGG
<i>myogenin</i>	GAGAAGGGAGGGAACGATAGGG	TGGCATCAGCACAGGAGACC
<i>actin</i>	TATGTATGTGGCTATTCAG	ATCAGGTAGTCAGTAAGG
<i>myosin 1</i>	TCTCTATCTCTGACAACGCCTAC	TGCTTCCTCCTTCTTCTTCC
<i>myosin IIa</i>	GGAGAAGACTAAGCAGCGGTTG	CAGCACAGGCAGCGTTGG
<i>myosin IIb</i>	TTCTCCATCTCTGATAATGCCTAC	GCTTCCTCCTTCTTCTTGTCC
<i>gapdh</i>	GCGAGATCCCGTCAAGATCA	CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG

Sequence of primers designed for the study of myod, myogenin, actin, myosin I, myosin IIa and IIb, and the reference constitutive gene gapdh.

Table 3. Serum biochemical parameters of offsprings submitted a maternal high-fat diet during gestation and lactation

	Control group	High-fat diet group	p
22 days			
Triacylglycerides (mg/dL)	71,78 ± 17,06	40,30 ± 13,26	0,0028*
Glucose (mg/dL)	101,1 ± 16,09	109,8 ± 19,73	0,4673
Total Cholesterol (mg/dL)	67,91 ± 12,16	58,67 ± 13,81	0,2176

Results are presented as means ± SD. Kolmogorov-Smirnov test followed by t test, *p<0,05.

APÊNDICE B- ARTIGO ORIGINAL 2**Long- term transcriptional responses in rat skeletal muscle to a High-Fat Diet during gestation and lactation**

¹*Thaysa de Oliveira L. SOUZA; ²Rhowena Jane B. MATOS; ²Raquel DA SILVA ARAGÃO; ²Ana Elisa TOSCANO; ^{3,1}Karla Mônica FERRAZ;

¹Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

²Department of Physical Education and Sports Science, Academic Center of Vitoria (CAV), Federal University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antão, 55608-680, Brazil

^{3,1}Departament of Physical Therapy, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, 50670-901, Brazil

*Corresponding author: T.O.L. SOUZA, e-mail: thaysafisio@gmail.com

Abbreviations: High-fat diet (HFD); *extensor digitorum longus* (EDL); actin gene (ACTA 1); myosin gene (MHC); control group (C); high-fat diet group (H); percentage of body weight gain (%BWG); glucose tolerance test (GTT); area under curve (AUC).

Acknowledgements

This research was supported by the Pro-Rectorry of Research and Post-Graduation – UFPE (PROPESQ) and CAPES.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Long- term transcriptional responses in rat skeletal muscle to a High-Fat Diet during gestation and lactation

Abstract

Aims: Gestation and lactation are considered critical periods because of their role in the plasticity of the animal's development, mainly related to obesity and metabolic syndromes. The nutritional manipulation during the critical period initiates modifications in the long-term of the muscular phenotype and genotype of the offspring. We assessed the long-term effects of a High Fat Diet (HFD) during gestation and lactation on RNAm of proteins related to contractile and metabolic functions in the skeletal muscle. **Main Methods:** Assessment of the weight, lipid, glycemic and gene expression (Real Time PCR) of muscular structural proteins (actin, myosin I, IIa and IIb) in the soleus and EDL (extensor digitorum longus) of adult rats at 90 and 180 days, born from mothers who consumed a control diet (14% fat) or HFD (46% fat) during gestation and lactation. **Key finds:** The weight of HFD animals at 90 and 180 days was lower. There were no changes in serum biochemistry. The long-term changes in gene expression revealed an increase in the overall contractile and oxidative capacity of the muscles. 90 days was considered an important age for establishing this profile. **Significance:** Maternal HFD caused metabolic imprinting in rat cubs. On the long term, there was remodeling at the mRNA level of contractile proteins and proteins related to muscle metabolism, which translates the potential of metabolic adaptation of this tissue and may be the beginning of a metabolic disorder. Modifications in gene expression may have occurred to ensure continuity of development, targeting a functional phenotype and metabolic health of the animals.

Keywords: Skeletal muscle; High-fat diet; Critical period of development; Muscle fiber type; mRNA profiling

Introduction

It is been established in the literature that the gestational and early postnatal periods are considered critical because of morphological and physiological alterations of the babies development occurring on short and long term (1,2). The definition of “plasticity of development” implies in ontogeny, since the periods of growth of the organism happen through the “critical window” of the organism’s sensibility, because of environmental factors that stimulate phenotypic plasticity in the organism (3). This reorganization potential of regulatory development elements means an adaptive plasticity on morphofunction (4).

Nutritional imbalances during early periods of life can influence functions related to skeletal muscle, like its mechanical properties and locomotor activity, in addition to altering the phenotype profile of the muscle fibers and the glucose/insulin metabolism in adulthood (5-7). The skeletal muscle has the ability to adapt its metabolism in response to nutrient ingestion and energy demands of the body. In fact, either the food deprivation or a high lipid diet favor the use of lipids by the muscle as an energy source instead of glucose, a phenomenon known as metabolic flexibility (8,9). The impaired metabolic flexibility have been associated with metabolic disorders like insulin resistance and obesity (10).

The skeletal muscle is metabolically characterized according to the specific fiber type. The type I fibers have a more oxidative metabolism, while the type IIb are the most glycolytic (11). The IIa fibers are intermediate between the oxidative and glycolytic activity and have a high capacity of modifying its metabolic characteristics along with external changes, like exercise and nutritional condition (12,13). Therefore, an adequate muscular function consists of a primary condition for a good health (14).

Studies using animals showed that the high-fat diet (HFD) could initiate a metabolic adjustment associated to the begging of obesity and type II diabetes because of an increase of adipose tissue storage (15) and decrease glycogen synthesis (16). Besides that, muscles with

particular characteristics, for example, soleus and EDL (extensor digitus longus) answered differently when exposed to nutritional manipulation (17,18).

It is being suggested that the HFD can modify the expression of genes related to muscular contraction, decreasing its expression. The impact of a variation on structural proteins gene expression can reflect on muscular function, either contractile or metabolic (18). This fact can be illustrated by the gene ACTA1, which codifies the α - actin, an isoform mainly found on the thin filaments of the sarcomere, and together with the myosin, is critical for the contraction of the skeletal muscle (19). This interaction between α - actin and the many heavy chains of myosin on different types of muscular fibers are the strength generators of the muscular contraction (19).

The impact of nutritional influence during the period of gestation and lactation on the metabolic flexibility and phenotypic plasticity on long term has been recently discussed in the literature. Hence, studies about the capacity of modifying gene expression of muscular fiber types became relevant for understanding the origin of phenotypical variability and its repercussions on the contractile tissue, and additionally, interpret the underlying mechanisms about the structural modifications on skeletal muscle associated with metabolic programming.

2. Materials and Methods

Experimental protocol was approved by the Ethical Committee in Animal Experimentation of Federal University of Pernambuco, Brazil (Protocol number: 23076.050504/2013-15) and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.1 Animals and Diet

Ten virgin female *Wistar* rats weighing 200-220g were obtained from the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (Brazil) and placed under a 12-h light/dark (dark 07:00- 19:00) cycle at room temperature of $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Food and water were given *ad libitum*. Females were mated at a ratio of 2:1. After confirmation of mating by the visualization of spermatozoa in a vaginal smear, dams were housed individually and divided into two groups according to dietary manipulation during pregnancy and lactation. Groups: C, control, fed standard animal laboratory food (Nuvilab®, CR1, Brazil); H, fed high-fat diet (46% fat) (Table 1). Diets were prepared in the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (Brazil), and their composition has been described previously (20,21) One day after birth, litter size was adjusted to eight pups per dam. At weaning (21 days), only male animals remained for the study, and all C and H pups were fed standard diet. The experimental muscle analyses were performed in a group of 90 and 180 days-old animals.

[insert table 1 near here]

2.2 Body weight

Offspring body weight was assessed at ages of 30, 90 and 180 days-old by using a scale (Marte** BL3200H) with 0.001g accuracy. Percentage of body weight gain (%BWG) was calculated as follows: $(\text{final body weight (g)} \times 100 / \text{initial body weight (g)}) - 100$ (22).

2.3 Serum biochemical assays and glucose tolerance test (GTT)

After overnight fasting, animals at 70 and 150 days were given an intraperitoneal dose of 2 g/kg of glucose (23). A drop of blood was taken immediately before the administration of glucose and 30, 60, 90 and 120 min after by severing the tip of the tail. Blood glucose was determined with a blood glucose monitor (Accu-Check Active®, Roche, Mannheim, Germany).

2.4 Muscle tissue and blood sampling

At 90 and 180 days-old, the rats were sacrificed by decapitation. Plasma from trunk blood collected at the time of killing and kept at -80°C until use for assays. Serum concentrations of triglycerides, glucose and total cholesterol were measured using commercial kit (LabTest, Minas Gerais, Brasil) (24). The soleus and EDL muscles were carefully dissected and rapidly frozen in dry ice and kept at -80°C until analysis by real time PCR.

2.5 Real time PCR

The real time PCR experiment was performed using the samples of the soleus and EDL muscles, through the following stages: 1) extraction of total RNA; 2) conversion of RNA into cDNA and; 3) amplification of the polymerase chain reaction. The total RNA was extracted using 1 ml of the Trizol reagent (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) with a homogenizer (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). The total RNA was isolated (Invitrogen[®]) and, subsequently, the quantity and quality of the purified RNA was evaluated using the spectrophotometer NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Next, the RNA samples were treated with a gDNA Wipeout solution (Qiagen[®], Hilden, Germany) in order to remove efficiently the contamination of the genomic DNA during 2 minutes at 42°C and then stored on ice. Posteriorly, a reverse transcription of 2,0 micrograms of RNA purified with cDNA (kit QuantiTect, Qiagen[®], Hilden, Germany), at 42°C during 15 minutes. The enzyme was inactivated at 95°C during 3 minutes. The preparation of cDNA was stored at -20°C until the time of its utilization.

Posteriorly, 5 ml of each cDNA diluted sample was utilized as *template* for the amplification of real time PCR, using SYBR Green (Qiagen[®], Hilden, Germany) as intercalating fluophore. The real time PCR detection system was Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen[®], Hilden, Germany). The PCR parameters were: the first stage of the initial

denaturation during 5 minutes at 95°C followed by 45 cycles of 5s at 95°C and 10s at 60°C.

The primers used for amplification are presented in Table 2.

[insert table 2 near here]

The fluorescence curves versus the number of PCR cycles during the exponential amplification were used to determine the limit values of the sample cycle threshold (CT). The standard curves for all the primer amplifications (or oligonucleotides) were generated by plotting the mean values of CT according to the logarithm of the number of template molecules. All the quantifications were normalized for the reference gene: *dehydrogenase glyceraldehyde-3-phosphate* (GAPDH). The value of the relative quantification of each target gene was analyzed using a comparative CT method (25). The formula “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ” was used to calculate the relative quantity of the transcript in the sample and normalized with the GAPDH endogenous reference.

Statistical analysis

The data was analyzed through the software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Initially, the normality test Kolmogorov-Smirnov was performed for all the analysis. After the confirmation of the data normality, for the weight and percentual weight gain of the rat cubs and TGG, the ANOVA two-way statistical test was used using repeated measures with post-test of Bonferroni. In relation to the gene expression, the test was the t Student. The values are presented in mean and standard deviation. The significance level adopted was $\alpha < 0,05$ for all the analyses.

3. Results

3.1 Weight evolution of the offspring

After weaning, the animals were assessed with 30, 90 and 180 days of life. In relation to body weight, differences were not observed at 30 days, but at 90 and 180 days, the rat cubs from the H groups showed lower weights in relation to the group C (30 days: C= $45,67 \pm 1,38$ g, n=11 vs. H= $59,32 \pm 6,8$ g, n=7, p=; 90 days: C= $337,7 \pm 8,15$ g, n=11 vs. H= $292,9 \pm 4,0$ g; n=7; p<0,001; 180 days: C= $405,8 \pm 9,4$ g, n=11 vs. H= $368,6 \pm 19,6$ g, n=7, p<0,001) (Figure 1A). Regarding the %BWG, the interval between 21-30 days, the animals from the mothers consuming HFD presented higher values (C= $13,22 \pm 8,74$ %, n=11 vs. H= $74,72 \pm 13,25$ %, n=7, p<0,0001). However, on the interval between 30-90 days, the animals of the H group gained less weight (C= $642,1 \pm 46,39$ %, n=11 vs. H= $400,7 \pm 70,83$ %, n=7, p<0,05).. The percentage of gain between 90-180 days was similar among the groups (C= $20,4 \pm 7,82$ %, n=11 vs. H= $25,85 \pm 5,63$ %, n=7, p>0,05) (Figure 1B).

[insert figure 1 near here]

3.2 Serum Biochemical analysis

The glycaemia, triglycerides and total cholesterol were similar between the groups in all ages (Table 3).

[insert table 3 near here]

3.3 Glucose Tolerance Test (GTT)

The rat cubs with 70 days of age, with the mother receiving the control and HFD diet showed the same response to glucose, as indicated by the identical glycemic increase during the interval between 0 and 30 minutes, and its decrease between 30 and 120 minutes after oral administration of glucose (Figure 2A). Moreover, within 150 days, animals from the H group showed a smaller glycemic peak on the 30^o minute (C= $175,2 \pm 8,28$ mmol/L, n = 5; H= $148,1$

$\pm 5,68$ mmol/L, $n=9$; $p<0,05$) (Figure 2B). The Area Under the Curve (AUC), corresponding to the TTG was similar between groups in all described ages (Figure 2C, D).

[insert figure 2 here]

3.4 Analysis of gene expression Real Time PCR

The rat cubs with 90 days of age with mothers that received HFD reported an increase of gene expression of myosin I and IIa of the soleus muscle, showing no difference in the other evaluated genes (Acta 1: $C= 1,53 \pm 1,34$, $n=4$ vs. $H= 2,08 \pm 0,24$, $n=4$, $p=0,45$; MHC1: $C= 1,01 \pm 0,17$, $n=3$ vs. $H= 2,18 \pm 0,35$, $n=4$, $p=0,0044$; MHCIIa: $C= 1,0 \pm 0,06$, $n=3$ vs. $H= 2,98 \pm 0,44$, $n=4$, $p=0,0007$; MHCIIb: $C= 1,108 \pm 0,59$, $n=4$ vs. $H= 2,12 \pm 0,88$, $n=4$, $p=0,1053$).

On the other hand, on the EDL muscle, the actin and myosin I genes showed lower expression in the rat cubs from the H group. The gene expression of myosin IIa and IIb did not vary at 90 days in the EDL (Acta 1: $C= 1,00 \pm 0,14$, $n=3$ vs. $H= 0,51 \pm 0,21$, $n=3$, $p=0,03$; MHC1: $C= 1,01 \pm 0,15$, $n=4$ vs. $H= 0,57 \pm 0,21$, $n=4$, $p=0,01$; MHCIIa: $C= 1,06 \pm 0,38$, $n=5$ vs. $H= 1,1 \pm 0,77$, $n=5$, $p=0,919$; MHCIIb: $C= 1,04 \pm 0,32$, $n=5$ vs. $H= 0,91 \pm 0,21$, $n=5$, $p=0,48$) (Figure 3).

[insert figure 3 near here]

At 180 days of life, there was an increase in the levels gene expression from actin, myosin I and IIa in the soleus muscle (Acta 1: $C= 1,046 \pm 0,34$, $n=5$ vs. $H= 2,35 \pm 0,87$, $n=4$, $p=0,0178$; MHC1: $C= 1,02 \pm 0,21$, $n=5$ vs. $H= 1,44 \pm 0,14$, $n=4$, $p=0,015$; MHCIIa: $C= 1,04 \pm 0,33$, $n=5$ vs. $H= 2,38 \pm 0,96$, $n=4$, $p=0,0223$; MHCIIb: $C= 1,22 \pm 0,87$, $n=4$ vs. $H= 2,32 \pm 0,81$, $n=4$, $p=0,115$). Regarding the EDL, there was a decrease only in the expression of

myosin IIb at 180 days (Acta 1: C= $1,01 \pm 0,17$, n=4 vs. H= $1,28 \pm 0,36$, n=3, p=0,23; MHC1: C= $1,02 \pm 0,25$, n=4 vs. H= $1,73 \pm 0,62$, n=3, p=0,089; MHCIIa: C= $1,02 \pm 0,26$, n=3 vs. H= $0,86 \pm 0,18$, n=3, p=0,43; MHCIIb: C= $1,00 \pm 0,08$, n=3 vs. H= $0,36 \pm 0,02$, n=3, p=0,0002) (Figure 4).

[insert figure 4 near here]

Discussion

The perinatal nutritional environment acting in the genesis of the metabolic diseases on adulthood has been one of the most directly studied programming factors (26). The mechanisms of programming induction seem to include: some cell clones may be changed by environmental adversity during development and the nutritional environment may permanently alter the gene expression (12). In the present study, we first examined the HFD effects during gestation and lactation on weight evolution, glucose tolerance, and serum biochemistry of rat cubs. Then, we studied the gene transcription of the ones responsible for being part of muscular contraction, as well as regulators of the muscular fiber type profile, acting on the musculoskeletal metabolism. On long term, the weight of the animals was lower, there was no difference in the TTG performance or serum biochemical profile, however, the maternal diet provoked different modifications along time according to the muscle on the gene expression assessment.

Previous studies indicated that rats cubs from mothers with an HFD during gestation and lactation presented an obese phenotype (i.e. increased body weight, hyperleptinemia, impaired glucose tolerance), appearing in the first postnatal weeks and maintained until the adulthood (27-29). In the present study, the animals from the H group presented a greater percentage of weight gain in the interval of 21-30 days and lower gain between 30-90 days.

Furthermore, the offspring of the HFD mothers had a lower weight between 90-180 days. Despite an increased weight gain at the end of weaning until 30 days, the weight between animals from the C and H groups became similar and then there was a deficit in adult life in the long term, agreeing with previously published data (30-32). Nevertheless, our results disagree with other findings already reported (24, 33-35). Previous results have reported that perinatal HFD may lead to increased insulin levels and malprogramming of central regulators of body weight and metabolism (36). There may be an early adaptation of hypothalamic mechanisms that control food intake (31), with lower levels of neuropeptide Y (NPY) mRNA, leading to hypophagia (37,38). On the other hand, there is evidence that an increase in the sensitivity of receptors to NPY was not sufficient to allow a greater weight gain (30). Other authors justify the lower weight gain by an adaptive thermogenesis (39).

Triglyceride levels and total cholesterol were similar between groups of different ages, which discord with literature data (24, 40, 41). In relation to TTG, there were no differences reported, but the H animals presented a lower glycemic peak at 30 minutes of test. Other studies also reported a normal TTG (35) and an increase of insulin levels (42) in adult rats after HFD during gestation and lactation. Evidence shows that HFD consumption causes metabolic imbalances and tendency to fat collections in the liver, skeletal muscle, additionally to appearance of chronic non-communicable diseases in adult life (20, 32, 43-45). In the present study, maternal nutritional manipulation was not enough to modify serum biochemical parameters and to induce insulin resistance in the rat cubs, even in the long term. This can be explained by the fact that there is an adaptive capacity for flexibility in relation to the energy fuel used, that is, an adaptation of the metabolism in response to the nutrient intake and energy demand of the organism, which is responsible for an efficient response to diet changes (10, 14, 32, 46).

In relation to metabolic programming concepts, our findings found a modified gene expression of the skeletal muscle over time and in a diverse way in muscles with different contractile metabolic profiles. Skeletal muscle is a heterogeneous tissue that has different fiber types that vary in the activity of its myofibrillar ATPase, contractile and metabolic properties (47). Type I fibers use fat as an energy substrate. In contrast, type II fibers use glucose as an energy source. Type IIa fibers have a mixture of glycolytic and oxidative properties, and IIb are exclusively glycolytic (14).

The gene expression of myosin I and IIa was increased in soleus muscle at 90 days. On EDL, there was a decrease of actin and myosin I gene expression. At 180 days, the actin, myosin I and IIa RNAm levels were higher on the soleus, while on EDL, the myosin IIB gene expression was decreased. We observed a different evolution from the traditional response according to the muscle (18) and the age (48). The changes brought by the maternal diet on the myosin I and IIa gene expression were stronger since they were maintained at 90 and 180 days. On the other hand, the expressions of the actin and myosin genes in the EDL were variable over time (42).

At 90 days, the RNAm levels may mean increased oxidative capacity of the soleus, as well as a muscle with a higher capacity of maintaining muscular contractions. In EDL, the gene expression depicts diminished contractile and oxidative capacities. As the metabolism of this fast muscle is predominantly glycolytic, the decrease in the myosin I gene expression confirms the adaptation of its metabolism to myofibrillar ATPase activity. In the more mature rat, at 180 days, HDF increased actin mRNA levels and the myosin I and IIa maintained the increased values in the soleus muscle. In EDL, at 180 days, the contractile proteins gene expression is balanced and similar between the groups, but the decrease of myosin IIb mRNA highlights the decrease in glycolytic metabolism.

Previous studies found an increased deposition of lipids in the skeletal muscle (49-51). The increased deposit of fat inside and around the muscle fibers is a sign of alterations on muscular metabolic profile (52). In fact, this alteration of fat storage and oxidation capacity can contribute to metabolic syndrome pathogenesis and precede its development (52). The profile of muscular fiber type is one of the factors that contribute to metabolic syndrome. Rats genetically modified to have a higher amount of fast fibers became resistant to obesity even after an HFD (53). Animals that became obese had a similar amount of type I and IIa fibers, suggesting an increase of the global oxidative capacity (54, 55). Mizunoya et al. (2013) evaluated the expression of contractile and metabolic genes after a high-fat diet and described an activation of oxidative metabolism. These results confirm the potential for metabolic adaptation of skeletal muscle (52).

Although there was no similar data on the literature to make comparisons, in the present study, the changes in the gene expression seem to represent the onset of a metabolic disorder. In long term, after HFD on the critical period of development, the rats showed lower weight and no changes on the biochemical profile, but muscle genotype changes did occur. It should be noted that this tissue is known for its high plasticity, ability to adapt its functioning according to stimuli and its role in the metabolic health (56). Thus, it is inferred that maternal nutritional manipulation caused a metabolic imprinting in the rat cubs muscle in the long term, capable of modifying its gene expression (57). Moreover, such modifications were permanent in the soleus and still dependent on the time in the EDL. Thus, it is understood that the remodeling of gene expression - with increased contractile and oxidative capacity - may have been necessary to maintain an appropriate phenotype and metabolic health of the animals. In addition, the age of 90 days seems to be an important period for the establishment of the contractile and oxidative profile of the muscle.

Conclusion

An HFD during gestation and lactation caused weight loss in the rat cubs, but no changes neither in the serum biochemical profile nor in long-term glucose intolerance. On the other hand, there was remodeling of contractile protein gene expression, additionally to a change related to skeletal muscle metabolism. There was an increase in actin, myosin I and IIa mRNA in the soleus, which means an intensification in the overall oxidative capacity of the muscle. Nutritional manipulation in the critical period caused metabolic imprinting in the offspring and the gene modifications in the muscle appear to be the onset of a metabolic impairment. Such genotypic profile adaptations reflect the adaptive potential of muscle tissue that occurs to maintain an appropriate muscle phenotype and metabolic health of the animals. Further research using this experimental model is necessary to better understand the origins of the phenotype development associated with the metabolic syndrome in adult rats.

References

1. OZANNE, S. E. *et al.* Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. J Endocrinol. v. 177, n. 2, p. 235-241. 2003.
2. BENYSHEK, D. C. The "early life" origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. Am J Phys Anthropol. v. 152, suppl 57, p. 79-93. 2013.
3. WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 102, suppl 1, p. 6543-6549. 2005.
4. BATESON, P.; GLUCKMAN, P; HANSON, M. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptative Response hypothesis. J Physiol. v. 492. , n. 11, p.2357-68. 2014.

5. BARROS, K. M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. Nutr Neurosci. v. 9, n. 1-2, p. 99-104. 2006.
6. TOSCANO, A. E., MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON. F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. Nutrition. v. 24, n. 3, p. 270-278. 2008.
7. DA SILVA ARAGAO, R. *et al.* Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. Br J Nutr. v. 112, n. 3, p. 328-337. 2014.
8. KELLY, L. A.; CHAVEZ, M.; BERTHOUD, H. R. Transient overconsumption of novel foods by deafferented rats: effects of novel diet composition. Physiol Behav. v. 65, v.4-5, p. 793-800. 1999.
9. CORPELEIJN, E.; SARIS W.H.; BLAAK, E. E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. Obes Rev. v. 10, n. 2, p. 178-193. 2009.
10. DUBE, J. J. *et al.* Effects of acute lipid overload on skeletal muscle insulin resistance, metabolic flexibility, and mitochondrial performance. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 307, n.12, p. 1117-1124. 2014.
11. NORMAN, A. M. *et al.* Postnatal development of metabolic flexibility and enhanced oxidative capacity after prenatal undernutrition. Reprod Sci. v. 19, n. 6, p. 607-614. 2012.
12. SAYER, A. A., COOPER, C. Fetal programming of body composition and musculoskeletal development. Early Hum Dev. v. 81, n. 9, p. 735-744. 2005.
13. ZHU, M. J. *et al.* Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. J Physiol. v. 575, n. 1, p. 241-250. 2006.
14. BROOK, M. S. *et al.* Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. Acta Physiol (Oxf). v. 216, n. 1, p. 15-41. 2016.
15. GAIVA, M. H. *et al.* Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. Br J Nutr. v. 86, n. 3, p. 371-377. 2001.

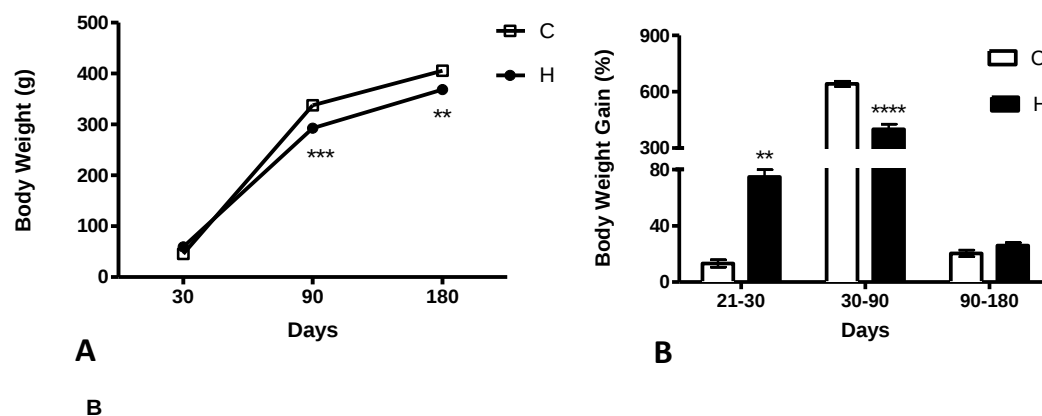
16. KIM, J. Y. *et al.* High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v. 279, n. 6, p. 2057-2065. 2000.
17. DE OLIVEIRA, C. *et al.* High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. Lipids Health Dis. v. 10, p. 11. 2011.
18. MIZUNOYA, W. *et al.* Dietary fat influences the expression of contractile and metabolic genes in rat skeletal muscle. PLoS One. v. 8, n. 11, p.80152. 2013.
19. LAING, N. G. *et al.* Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). Hum Mutat. v. 30, n. 9, p. 1267-1277. 2009.
20. ESTADELLA, D. *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. Nutrition. v. 20, n. 2, p. 218-224. 2004.
21. ALHEIROS-LIRA, M.C. *et al.* Effects of high-fat diet on somatic growth, metabolic parameters and function of peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet. Brit J Nutri. v. 117, p. 796-803.
22. BAYOL, S. *et al.* The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. Br J Nutr. v. 91, n. 3, p. 331-339. 2004.
23. BIELOHUBY, M. *et al.* Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 305, n.9, p. 1059-1070. 2013.
24. OLIVEIRA, T. W. S. *et al.* A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. Lipids. v. 46, n. 11, p. 1071-1074. 2011.
25. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods. v. 25, p. 402-8. 2001.
26. BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory." J Intern Med. v. 261, n. 5, p. 412-417. 2007.
27. PURCELL, R.H. *et al.* Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. Physiol. Behav. v. 104, p. 474-479. 2011.

28. ROTHER, E. *et al.* Hypothalamic JNK1 and IKK β activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding. Endocrinology. v.153, 2012.
29. SUN, B. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. Diabetes. v. 61, p. 2833–2841. 2012.
30. KOZAK, R.; BURLET, A.; BURLET, C.; BECK, B. Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. Development Brain Research. v. 125, p. 75-82. 2000.
31. ALBUQUERQUE, K. T *et al.* Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. Nutrition. v. 22, n. 7-8, p. 820-829. 2006.
32. PISANI, L. P. *et al.* Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine mRNA in 21-day-old rats. Nutrition. v. 24, n. 3, p. 255-261. 2008.
33. HAUSMAN, D.B.; MCCLOSKEY, H.M.; MARTIN, R.J. Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. J Nutr. v. 121, n. 12, p. 1917-23. 1991.
34. AKYOL, A.; MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S.C. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. Br J Nutr. v. 107, n.7, p. 964-78. 2012.
35. PLATT, K.M.; CHARNIGO, R.J.; PEARSON, K.J. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. J. Dev. Orig Health Dis. v. 5, n. 3, p. 229-39. 2014.
36. SRINIVASAN, M. *et al.* Maternal high-fat diet consumption results in fetal mal-programming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 291, p. 729-99. 2006.
37. WANG, H., STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. Am J Physiol Endocrinol Metab. v. 282, n. 6, p. 1352-1359. 2002.

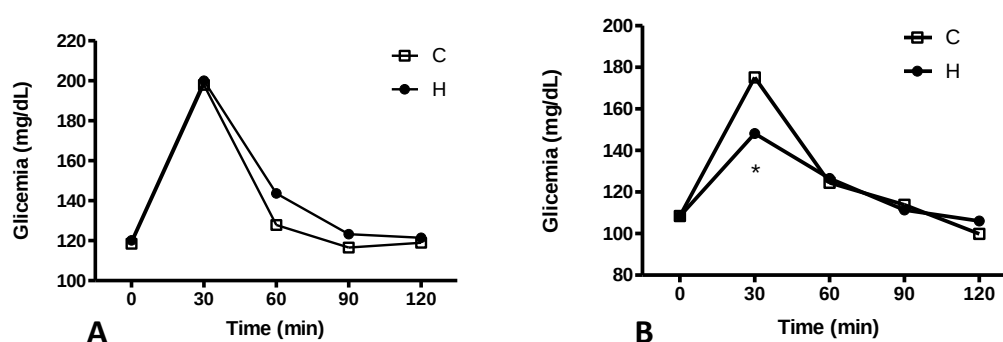
38. DZIEDZIC, B. *et al.* Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. J Neuroendocrinol. v. 19, n. 5, p. 364-373. 2007.
39. TAKEUCHI, H.; MATSUO, T.; TOKUYAMA, K.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Dietinduced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. J Nutr. v. 125, p. 920-925. 1995.
40. ELAHI, M.M. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. British Journal of Nutrition. v.102, p. 514-519. 2009.
41. HUANG, Y.; YE, T.; LIU, C.; FANG, F.; CHEN, Y.; DONG, Y. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. J. Biosci. v. 42, n. 2, p. 311–319. 2017.
42. LATOUCHE, C. *et al.* Maternal overnutrition programs changes in the expression of skeletal muscle genes that are associated with insulin resistance and defects of oxidative phosphorylation in adult male rat offspring. J Nutr. v. 144, n. 3, p. 237-244. 2014.
43. BAYOL, S. A. *et al.* Evidence that a maternal "junk food" diet during pregnancy and lactation can reduce muscle force in offspring. Eur J Nutr. v. 48, n. 1, p. 62-65. 2009.
44. OBEN, J.A. *et al.* Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. Journal of Hepatology. v. 52, p. 913-920, 2010.
45. CHOI, M-S. *et al.* High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. Brit J Nutr. v. 113, p. 867-877. 2015.
46. SIEMELINK, M., A. *et al.* Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. Diabetologia. v. 45, n. 10, p. 1397-1403. 2002.
47. PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibers during development and ageing. Acta Histochemica, v. 106, n. 2; p. 145-154. 2004.

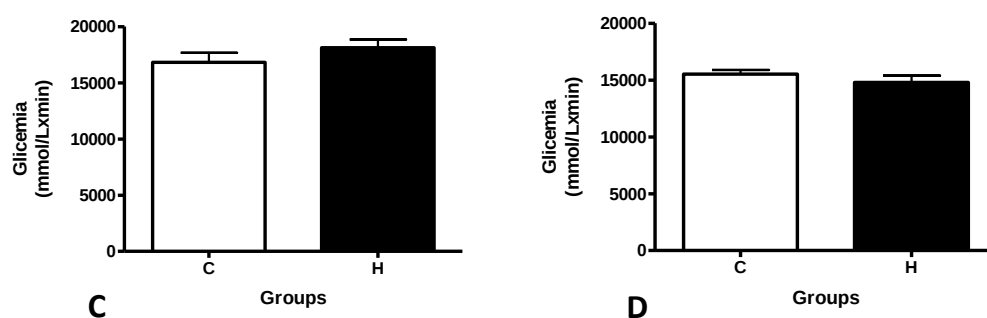
48. ESHIMA, H.; TAMURA Y.; KAKEHI, S.; KUREBAYASHI, N.; MURAYAMA, T.; NAKAMURA, K. *et al.* Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force on mouse fast-twitch skeletal muscle. Physiological Reports. v. 5, n.7, p.1-12. 2017
49. COLLINO, M. *et al.* Variability in Myosteatosis and Insulin Resistance Induced by High-Fat Diet in Mouse Skeletal Muscles. BioMed Research International. v. 2014, p.1-10. 2014.
50. ROMERO, M. *et al.* Treatment of rats with a self-selected hyperlipidic diet, increases the lipid content of the main adipose tissue sites in a proportion similar to that of the lipids in the rest of organs and tissues. PLoS One. v.9, n. 3, e90995. 2014.
51. KOMIYA, Y. *et al.* Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. J Muscle Res Cell Motil. 2017.
52. KELLEY, D. E. *et al.* Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes. v. 51, n.10, p. 2944-2950. 2002.
53. SUWA, K. *et al.* Co-existence of nemaline and cytoplasmic bodies in muscle of an infant with nemaline myopathy. Neuropathology. v. 22, n. 4, p. 294-298. 2002.
54. SUWA, M.; NAKAMURA, T.; KATSUTA, S. Muscle fibre number is a possible determinant of muscle fibre composition in rats. Acta Physiol Scand. v. 167, n. 3, p. 267-272. 1999.
55. IOSSA, S. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. Int J Obes Relat Metab Disord. v. 26, n. 1, p. 65-72. 2002.
56. VERDIJK, L.B. *et al.* Satellite cells in human skeletal muscle: from birth to old age. Age. v. 36, n. 2, p. 545-7. 2014
57. WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. Am J Clin Nutr. v. 62, n. 2, p. 179-97. 1999.

Figures

Figure 1. Offspring body weight evolution after weaning.

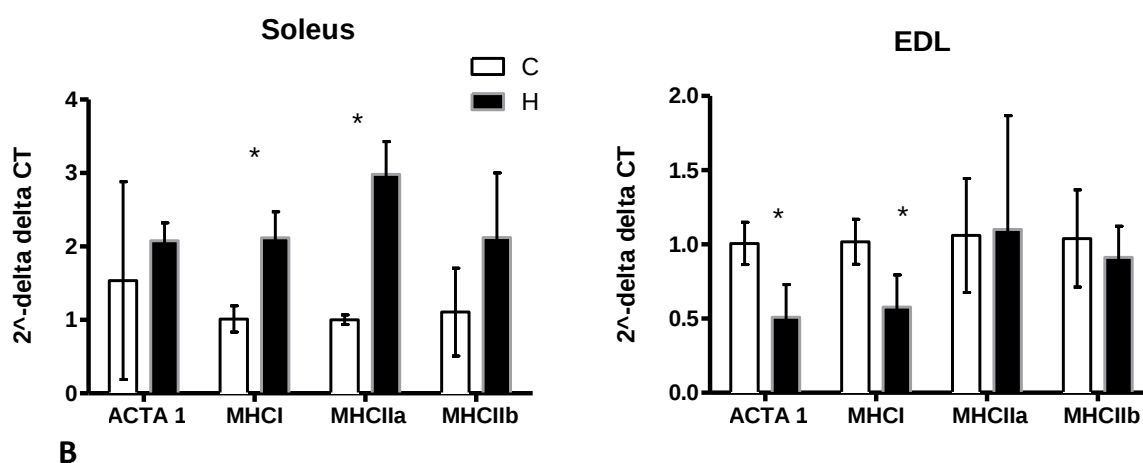
Body weight (A), percentage of body weight after weaning. Groups according to maternal diet during gestation and lactation: Control diet (C, n=11); High-fat diet (H, n=7). Data are mean $\pm$ DP. Two way ANOVA test, followed by post-hoc test Bonferroni, *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Figure 2. A blood glucose concentrations and area under curve (AUC) graphs in C and H after and intraperitoneal glucose challenge at 70 and 150 days.



Blood glucose levels and the respective area under the curve (AUC). A, C: 70° day glucose tolerance test (GTT); B, C: 150° days GTT. White, control group (C); Black, high-fat diet (H). Anova two-way (A,B) and student's t test (C, D). Data are presented as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$.

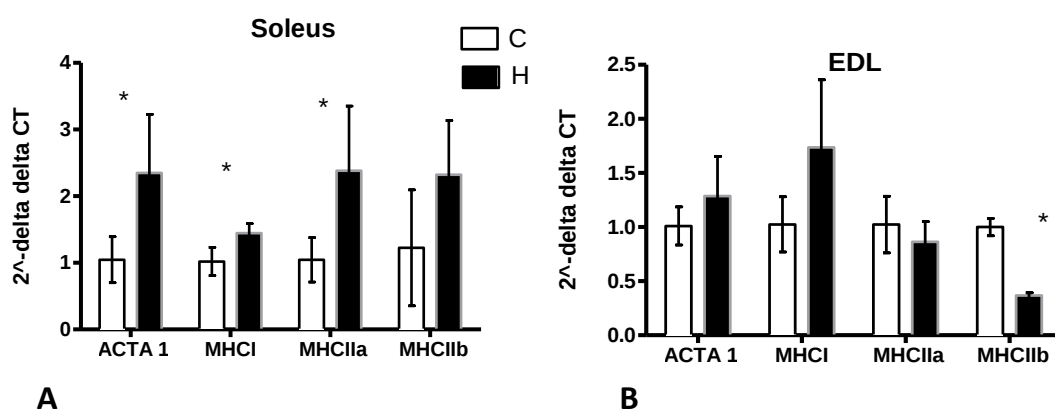
Figure 3. Relative amount of muscles soleus and EDL mRNA ACTA 1, Myosin I, Ila and I Ib in offsprings at 90 days.



The pairs of columns represent the expression of mRNA relative levels of ACTA 1, MHC I, Ila and I Ib in soleus and EDL muscles to endogenous GAPDH amplified in the same sample under the same experimental conditions at 90 days. (A: Soleus ACTA 1, MHC I, Ila and I Ib;

B: EDL ACTA 1, MHC I, IIa and IIb). Each pairs of columns represents MD $\pm$ SD of 2 different samples of mRNA. The analyses were made in triplicates and there was less than 5% variation among the values obtained, t test.

Figure 4. Relative amount of muscle soleus and EDL mRNA ACTA 1, Myosin I, IIa and IIb in offsprings at 180 days.



The pairs of columns represent the expression of mRNA relative levels of ACTA 1, MHC I, IIa and IIb in soleus and EDL muscles to endogenous GAPDH amplified in the same sample under the same experimental conditions at 180 days. (A: Soleus ACTA 1, MHC I, IIa and IIb; B: EDL ACTA 1, MHC I, IIa and IIb). Each pairs of columns represents MD $\pm$ SD of 2 different samples of mRNA. The analyses were made in triplicates and there was less than 5% variation among the values obtained, t test.

Tables

Table 1. Chemical composition of control diet and high-fat diet used in the experiments.

Chemical composition	Control Diet* (g/100g)	High-Fat Diet (g/100g)
Carbohydrate	47,76	38,08
Protein (N x 6,25)	28,85	27,24
Lipids	5,63	25,37
Ashes	7,91	4,88
Humidity and volatile substances	9,85	4,43
Total energy (Kcal/100g)	357,11	489,61
Carbohydrate (%VET)	53,50	31,11
Protein (%VET)	32,31	22,26
Lipid (%VET)	14,19	46,63

The centesimal composition was analyzed at the Laboratory of Food Analysis/UFPE.

*Nuvilab ®, CR1, Brasil.

Table 2. Primers used for amplification.

Gene	Foward Primer	Reverse Primer
<i>actin</i>	TATGTATGTGGCTATTCAG	ATCAGGTAGTCAGTAAGG
<i>myosin 1</i>	TCTCTATCTCTGACAACGCCTAC	TGCTTCCTCCTTCTTCTTCC
<i>myosin IIa</i>	GGAGAAGACTAAGCAGCGGTTG	CAGCACAGGCAGCGTTGG
<i>myosin IIb</i>	TTCTCCATCTCTGATAATGCCTAC	GCTTCCTCCTTCTTCTTGTCC
<i>gapdh</i>	GCGAGATCCCGTCAAGATCA	CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG

Sequence of primers designed for the study of actin, myosin I, myosin IIa and IIb, and the reference constitutive gene gapdh.

Table 3. Serum biochemical parameters of offsprings submitted a maternal high-fat diet during gestation and lactation

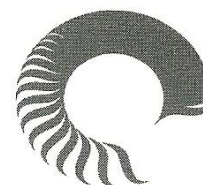
	Control group	High-fat diet group	p
90 days			
Triacylglycerides (mg/dL)	66,70 ± 18,40 (n=7)	70,96 ± 20,97 (n=10)	0,6715
Glucose (mg/dL)	104,3 ± 12,75 (n=5)	118,2 ± 32,82 (n=10)	0,3837
Total Cholesterol (mg/dL)	52,53 ± 14,20 (n=4)	46,39 ± 17,13 (n=6)	0,5713
180 days			
Triacylglycerides (mg/dL)	47,95 ± 6,41 (n=6)	55,30 ± 15,27 (n=10)	0,2858
Glucose (mg/dL)	93,48 ± 33,73 (n=6)	103,9 ± 18,56 (n=9)	0,4515
Total Cholesterol (mg/dL)	31,38 ± 6,06 (n=5)	36,87 ± 18,56 (n=9)	0,0879

Results are presented as means ± SD. Kolmogorov-Smirnov test followed by t test, *p<0,05.

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 17 de dezembro de 2013.

Ofício nº 666/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª. Karla Monica Ferraz Teixeira Lambertz**

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Nutrição

Processo nº 23076.050504/2013-15

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***“Repercussões da dietahiperlipídica e hipercalórica durante o período de desenvolvimento sobre as propriedades mecânicas no músculo estriado esquelético de ratos”***.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Origem dos animais: Biotério de criação do Departamento de Nutrição; Animal: rato heterogênico; Linhagem: Wistar; Idade; 90 dias Sexo: Peso; 300g; macho e fêmeas; Nº Total de Animais: 72.


Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

ANEXO II – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA HIPERLIPÍDICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO E ANÁLISES DE ALIMENTOS
NINETE BARBOSA GUERRA

Página 1 de 1

CERTIFICADO DE ENSAIO Nº 976/14

Data de Emissão: 26/05/2014

SOLICITANTE		DATA DE ENTRADA
PROFESSOR RAUL MANHÃES DE CASTRO		13.05.2014
ENDEREÇO DO SOLICITANTE		
Departamento de Nutrição do CCS/UFPE – Cidade Universitária – Recife – PE		
NATUREZA DO PRODUTO		Marca
DIETA HIPERLIPÍDICA		-
Outras Informações:	Lote	Data de fabricação:
Trabalho de tese.	-	-
Data de validade:		-
AMOSTRA: aproximadamente 100g, coletada pelo solicitante.		

FÍSICO-QUÍMICA

ENSAIOS	RESULTADOS
Umidade e Substâncias Voláteis (g/100g)	4,43
Método: Adolfo Lutz, 2005	
Proteínas (N x 6,25) (g/100g)	27,24
Método: Adolfo Lutz, 2005	
Gordura (g/100g)	25,37
Método: Adolfo Lutz, 2005	
Cinzas (g/100g)	4,88
Método: Adolfo Lutz, 2005	
Carboidratos (g/100g)	38,08
Método: por cálculo/ASCAR, 1985	
VCT (kcal/100g)	489,61
Método: por cálculo	
Observações:	-
Conclusão:	-

Informamos que os resultados são referentes à amostra analisada e que a reprodução deste certificado só é permitida na íntegra.

Sebastião Camilo de Melo Filho
Gerente Técnico Setor de Físico-Química

Recife, 26 de maio de 2014

Profa. Dra. Silvana Magalhães Salgado
Coordenadora LEAAL

ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1

Muscle & Nerve



Muscle and Nerve

Effects of a maternal High-Fat Diet on expression of genes controlling Skeletal Muscle Development and contraction proteins in weaning rat offspring

Journal:	<i>Muscle and Nerve</i>
Manuscript ID	MUS-17-0685
Wiley - Manuscript type:	Basic Science Research Article
Date Submitted by the Author:	28-Aug-2017
Complete List of Authors:	Souza, Thaysa; Departament of Nutrition, UFPE Matos, Rhowena; Department of Physical Education and Sports Science Academic Center of Vitoria Aragão, Raquel; Department of Physical Education and Sports Science Academic Center of Vitoria Toscano, Ana Elisa; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutricao, Centro de Ciencias da Saude Ferraz, Karla; UFPE, Departament of Physical Therapy
Keywords:	Skeletal muscle, High-Fat Diet, Myogenic Regulatory Factors, Muscle fiber type, Critical period of development, Gene expression

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO IV – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

Life Sciences

Contact us
Help ?

Intermittent SOLR search service for Editors and Reviewers [...more](#)

[Home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: [thaysafisio@gmail.com](#)
Switch To: [Author](#) ▼ Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2017.7

Submissions Being Processed for Author Thaysa O L Souza

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 ▼ results per page.

Action ▲ ▼	Manuscript Number ▲ ▼	Title ▲ ▼	Initial Date Submitted ▲ ▼	Status Date ▲ ▼	Current Status ▲ ▼
Action Links		Long-term transcriptional responses in rat skeletal muscle to a High-Fat Diet during gestation and lactation	08/29/2017	08/29/2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 ▼ results per page.

<< Author Main Menu