

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, EXPRESSÃO
DOS FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA (MRFS) E
DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS (NACHRS) NO MÚSCULO
ESTRIADO DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO
PROTÉICA MATERNA.**

LUDIMILA CANUTO CABEÇO

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

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

BOTUCATU – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, EXPRESSÃO
DOS FATORES DE REGULAÇÃO MIOGÊNICA (MRFS) E
DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS (NACHRS) NO MÚSCULO
ESTRIADO DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO
PROTÉICA MATERNA.**

LUDIMILA CANUTO CABEÇO

MAELI DAL PAI SILVA

SELMA MICHELIN MATHEUS

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

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cabeço, Ludimila Canuto.

Caracterização morfológica, expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e dos receptores nicotínicos (nAChRs) no músculo estriado de ratos submetidos a restrição protéica materna / Ludimila Canuto Cabeço. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maeli Dal Pai Silva

Co-Orientador: Selma Michelin Matheus

Capes: 40101002

1. Esqueleto - Músculos. 2. Morfologia.

Palavras-chave: Expressão gênica; Expressão protéica; Músculo esquelético; Morfologia; Programação fetal; Ratos.

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu noivo Eduardo, os quais sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram no meu trabalho. Sou muito grata por todo amor, carinho e pela companhia de vocês...”

Agradecimentos

Agradeço ao meu futuro esposo Eduardo Alves Faccioni que amo tanto, por toda dedicação, amor e carinho.

Agradeço aos meus pais José Carlos e Fátima, irmã Janaína e cunhado Danilo pelo amor, pelo apoio e torcida.

Agradeço a profa. Maeli Dal Pai Silva, pela orientação, pelo exemplo de profissional competente, pela paciência, pela confiança em meu trabalho, pelo incentivo pessoal em todos os setores da minha vida e auxílio prestado em todos os momentos os quais precisei.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Paulo Eduardo Budri e Mirella Baroni, com os quais eu ingressei no ofício de co-orientar cientificamente.

Agradeço a coordenação da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, a todos da secretaria de Pós-Graduação e à Luciana Cristina Montes, do Departamento de Morfologia, pela colaboração em todos os momentos que precisei.

Agradeço a professora co-orientadora Selma Michelin Matheus pela colaboração e preocupação para que tudo desse certo tanto na minha pesquisa, minha vida pessoal como na minha formação como docente.

Agradeço às amigas Paula Souza Aiello e Giovana Rampazzo pelas conversas tão cheias de valores e de Deus, pelo carinho, ajuda, incentivo e companheirismo.

Agradeço aos queridos companheiros do Departamento de Morfologia: Paulinha, Ivan, Prof. Robson, Edson, Andreo & Raquel, Rodrigo, Juliana (Olha), Eduardo (Moçoila), Marcão, Carol (Jaca), Carina (Lesma), Clarianna e Júlio que sempre tiveram palavras de incentivo, acolhedoras e sinceras e os quais sentirei muita falta quando tomar outros caminhos.

Agradeço as pessoas que passaram por minha vida nesse período e que me fizeram inevitavelmente refletir sobre muitas atitudes e ações.

Agradeço à Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo crédito ao trabalho e incentivo financeiro.

Enfim, a todos aqueles que durante essa jornada fizeram dos meus dias, dias mais produtivos, reflexivos e alegres para que eu concluísse esse trabalho.

SUMÁRIO

1- RESUMO	4
2- ABSTRACT	5
3- INTRODUÇÃO	6
4- REVISÃO DA LITERATURA.....	7
4.1 Considerações gerais sobre o músculo estriado esquelético	7
4.2 Miogênese e diferenciação dos tipos de fibras musculares.	11
4.3 Desenvolvimento das Junções Neuromusculares	17
4.4 Programação fetal da Musculatura Estriada Esquelética.....	19
5- OBJETIVOS	21
6- MATERIAIS E MÉTODOS	22
6.1 Manipulação das dietas.....	22
6.2 Acasalamento dos animais.	23
6.3 Tratamento dos grupos experimentais.....	25
6.4 Eutanásia dos animais e coleta dos músculos de interesse.....	25
6.5 Estudo morfométrico das fibras musculares.....	26
6.6 Estudo ultraestrutural das Junções Neuromusculares.....	27
6.7 Avaliação quantitativa da expressão gênica de Miogenina, MyoD e das subunidades dos receptores de acetilcolina (α , γ e ϵ) por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).	28
6.8 Western Blotting para as proteínas MyoD e Miogenina.	32
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8- CAPÍTULO I.....	44
9- CAPÍTULO II	44
catch-up growth in adulthood offspring fed with diet content 23% protein from birth until 16-week-old.....	45
10- CONCLUSÕES.....	95

1- RESUMO

A restrição protéica materna pode afetar vários parâmetros morfofuncionais da prole com conseqüências na vida adulta. Esse fenômeno, conhecido como programação fetal, pode causar mudanças na musculatura esquelética a longo prazo. Neste trabalho foram analisadas a morfologia e histoquímica dos tipos de fibras musculares, a expressão gênica e protéica dos fatores reguladores miogênicos MyoD e Miogenina, a morfologia das junções neuromusculares (JNMs) e a expressão gênica das subunidades (α , γ e ϵ) que compõe os receptores nicotínicos de acetilcolina, nos músculos Soleus (SOL) e Extensor longo dos dedos (EDL) de ratos machos (30 dias e 16 semanas de idade), provenientes de mães alimentadas com dieta de baixa proteína (6%, LP, n=8) durante a gestação e alimentadas com dieta normoprotéica (17%, NP=8) após o nascimento dos filhotes. Nos períodos analisados, os músculos SOL e EDL foram submetidos à reação histoquímica mATPase para a análise da frequência (%) e área (CSA) das fibras; a morfologia das JNMs foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão; a expressão gênica e protéica foram determinadas pelo RT-qPCR e Western Blot, respectivamente. Nossos resultados mostraram que ao nascimento e com 30 dias de idade, o peso corporal dos filhotes do grupo LP foi estatisticamente menor comparado aos filhotes do grupo NP e com 16 semanas de idade, nenhuma diferença foi observada no peso corporal. Aos 30 dias de idade, o peso do músculo SOL foi menor no grupo LP comparado ao NP ($P<0,05$) e nenhuma diferença estatística foi observada no peso do músculo EDL. Com 16 semanas de idade, a razão peso muscular/peso corpóreo foi menor no músculo SOL e nenhuma diferença estatística foi observada no músculo EDL. Aumento na frequência das fibras tipo IIB e diminuição das fibras tipo I e IIA+IID no músculo EDL e nenhuma diferença na frequência das fibras do músculo SOL foi observado no grupo LP, com 30 dias de idade. Com 16 semanas de idade, não houve diferença na frequência das fibras do grupo LP, em ambos os músculos estudados. No grupo LP, a área das fibras tipo I mostrou-se diminuída somente no músculo SOL em todos os períodos estudados. A expressão de MyoD e Miogenina não foi afetada pela restrição protéica materna. No entanto, as JNMs apresentaram alterações morfológicas no músculo SOL e redução da expressão gênica das subunidades dos nAChRs no músculo EDL, $P<0,05$; resultados apresentados somente em filhotes com 30 dias de idade. Nossos resultados mostraram que a restrição materna de proteínas induziu mudanças morfológicas mais proeminentes no músculo SOL e não alterou a expressão da MyoD e Miogenina; alterou a expressão gênica das subunidades que compõe os nAChR do músculo EDL e promoveu mudanças nas JNMs somente na prole com 30 dias de idade; além disso, promoveu crescimento compensatório na prole adulta.

2- ABSTRACT

The maternal protein restriction can affect various morphophysiological parameters in offspring with consequences in adulthood. This phenomenon, known as fetal programming, can cause changes in skeletal muscle phenotype in long term. We investigated muscle fiber type changes, MyoD and Myogenin expression, neuromuscular junction (NMJs) morphology and α , γ and ϵ nAChRs subunits expression in SOL and EDL muscles in offspring rats, with 30 and 16-weeks-old, from dams fed with low protein diet (6% protein, LP, $n=8$) and normoproteic diet (17% protein, NP, $n=8$). Muscles collected were submitted to myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry reaction for muscle fiber types frequency and the cross sectional areas (CSA) analysis. The neuromuscular junction (NMJs) morphology was analyzed using transmission electron microscope. The gene and protein expression were determined by RT-qPCR and Western Blot, respectively. Our results showed that at birth and with 30-days-old, the body weight of pups was statistically lower in LP compared to NP group; at 16-week-old, no significant difference were observed. At 30-days, the SOL muscle weight (g) was lower in LP compared to NP group ($P<0.05$) and no statistical difference was observed in the EDL muscle weight. At 16-week-old, SOL muscle weight/body weight ratio was lower in LP group compared to NP group, $P<0.05$. Increasing in IIB and decreased in I and IIA+IID fiber frequency in EDL muscle and no difference in fiber frequency in SOL muscle were observed in LP group, with 30-days-age. At 16-weeks-age, there were no differences in muscle fiber types frequency for both muscles. In LP group, muscle fiber I CSA decreased only in SOL muscle in all periods studied. MyoD and Myogenin expression no changes in response to maternal protein restriction. SOL NMJs in LP group presented a decreased in the synaptic folds; in the terminal axons, myelin figures and endoplasmic reticulum dilated also were frequently observed. These changes were more evident in offspring with 30-days-old. Regarding to nAChRs mRNA expression, only EDL muscle from LP offspring with 30-days-old showed decrease in α , γ and ϵ nAChRs subunits, $P<0.05$. Our results showed that maternal protein restriction affects specific muscle fiber types in offspring without alter MyoD and Myogenin expression; furthermore, alter gene expression of nAChR in EDL muscle, promote alterations in SOL NMJs in offspring only with 30 days old and induce catch-up growth in adulthood offspring.

3- INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos humanos e experimentais em diferentes espécies têm demonstrado que estímulos de diferentes naturezas ocorridos durante um período crítico do desenvolvimento podem provocar alterações permanentes sobre a estrutura e função dos órgãos da prole (Forsdahl, 1978; Lucas, 1991; Hales & Barker, 1992; Ashton et al., 2005; Fowden et al., 2006; Gohlke et al., 2011). Esse fenômeno, no qual a mãe sofre as influências do meio e geralmente o filhote sofre as consequências, é conhecido como "programação fetal" e pode ter efeitos morfofisiológicos que levam a quadros patológicos a longo prazo (Lucas, 1991; Fowden et al., 2006).

De fato, nos últimos anos, muitos estudos vêm demonstrando ligação entre a programação fetal e muitas doenças que são desenvolvidas na vida adulta (Fowden et al., 2006), como doenças cardiovasculares (Barker et al., 2002), hipertensão (Zandi-Nejad & Brenner, 2006), resistência à insulina (Hales et al., 1992; Barker et al., 2002) e síndrome metabólica (Desai & Ross, 2007).

A desnutrição materna é um dos fatores que pode afetar a morfofisiologia de tecidos e órgãos da prole (Snoeck et al., 1990; Dahri et al., 1991; Langley-Evans et al., 1999; Abdel-Hakeem et al., 2008; Porrello et al., 2008), incluindo a musculatura esquelética (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006; Mallinson et al., 2007; Toscano et al., 2008). Esse tecido é composto por fibras musculares que apresentam diferentes propriedades metabólicas e contráteis e alta capacidade de modulação em respostas a estímulos como exercício físico (Magaudda et al., 2004), desnervação (Dow et al., 2004), imobilização (Jackman & Kandarian, 2004), envelhecimento (Larsson & Ansved, 1995) e o tipo de nutrição (Matsaka & Patel, 2009).

Estudos envolvendo o músculo esquelético têm demonstrado que a deficiência de nutrientes durante a gestação e amamentação, essenciais ao desenvolvimento inicial da prole, promove alterações permanentes no músculo esquelético, como mudança na frequência e área das fibras musculares (Bedy et al., 1982; Wilson et al., 1988; Beermann, 1983; Ozzane, 2003). Além disso, a restrição alimentar materna pode induzir diferentes respostas sobre a musculatura esquelética da prole de diferentes espécies, se imposta em estágios específicos da gestação (Zhu et al., 2006; Malisson et al., 2007; Daniel et al., 2007).

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado alterações na morfologia muscular em função da desnutrição materna, pouco se sabe sobre o envolvimento de

fatores moleculares que regem o desenvolvimento e crescimento muscular e que, garantem o fenótipo da fibra muscular nessas condições. Entre esses fatores, destacam-se os Fatores de Regulação Miogênica, os MRFs (Seale & Rudnicki, 2000; Hawke & Garry, 2001; Watabe, 2001; Rescan, 2001). Os MRFs são fatores que controlam a expressão de genes músculo-específico, entre os quais os responsáveis pela expressão de proteínas estruturais, contráteis (Lin e al, 1991; Allen et al., 2001) e das subunidades que compõe os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) que estão presentes na região pós sináptica da junção neuromuscular (JNM), sendo responsáveis pela transmissão do impulso nervoso para o músculo (Piette et al., 1990; Gilmour et al., 1991; Numberger et al., 1991; Prody & Merlie, 1991; Simon & Burden, 1993, Liu et al., 2000, Charbonnier et al., 2003).

A JNM é uma sinapse química formada pela região de contato do terminal nervoso motor com a fibra muscular (Hall & Sane, 1993); sua formação está intrinsecamente envolvida com o desenvolvimento do músculo e a morfofisiologia é dependente do tipo de fibra muscular (Hirano, 1967; Pun et al., 2002).

Assim como o músculo, as JNMs também apresentam alta capacidade de modulação (Worden, 1998). Jin et al (2008) sugerem que mudanças na JNM podem modular as propriedades morfofuncionais do músculo esquelético.

Pesquisas recentes avançam na compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos no processo de adaptação tecidual na programação fetal. Como já é conhecido que a restrição protéica materna influencia as características morfofuncionais nos músculos da prole a longo prazo, é possível que, essa condição possa alterar os fatores moleculares que regulam os processos miogênicos, bem como, as junções neuromusculares. O entendimento dos eventos que regulam o processo de modulação fenotípica muscular e das JNMs nesta condição pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias que recuperem o músculo afetado a longo prazo.

4- REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Considerações gerais sobre o músculo estriado esquelético

A função primária do tecido muscular esquelético é assegurar a locomoção, a atividade postural e os movimentos corporais. Esse tecido é constituído por fibras musculares que apresentam características morfológicas, metabólicas e funcionais

distintas além da capacidade de modulação (Mastaglia & Detchant, 1992; Schiaffino & Reggiani, 1994; Pette & Staron, 2000).

A fibra muscular é uma célula longa, cilíndrica e multinucleada (Figura 1 e 2) (Mastaglia & Detchant, 1992); apresenta capacidade de contração, é formada por unidades organizadas denominadas de sarcômeros, os quais conferem à fibra muscular o aspecto estriado (Figura 1 e 3). Unidades sucessivas de sarcômeros formam as miofibrilas (Mastaglia & Detchant, 1992)(Figura 1).

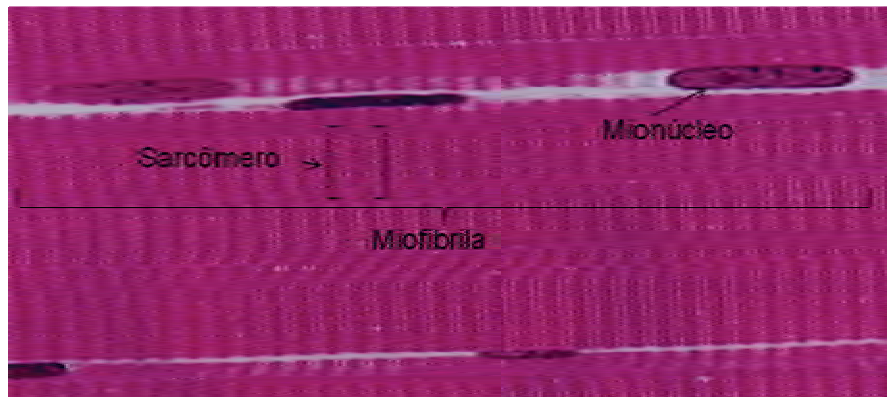


Figura 1. Corte longitudinal de músculo estriado esquelético, corado com Hematoxilina e Eosina, mostrando a distribuição das fibras musculares, mionúcleos e os sarcômeros. Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

Os sarcômeros são constituídos por proteínas estruturais e contráteis, destacando-se as proteínas contráteis miosina (filamentos grosso formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II) e actina (filamentos fino associado às proteínas reguladoras troponina e tropomiosina) (Mastaglia & Detchant, 1992). A miosina é formada por seis polipeptídios: duas cadeias pesadas de miosina (MHC) enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves de miosina (MLC) (Lowey et al., 1969; Huxley, 1969; Elliott & Offer, 1978). Uma das porções do MHC conhecida como porção globular da miosina, contém um sítio de interação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP, a qual apresenta atividade ATPásica (Lowey et al., 1969; Huxley, 1969). Essa porção globular representa o componente fundamental para o mecanismo de contração muscular.

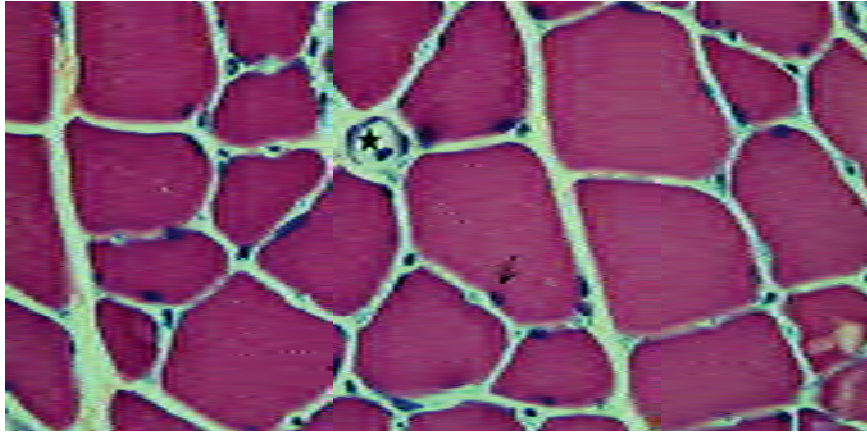


Figura 2. Corte transversal do músculo estriado esquelético, corado com Hematoxilina e Eosina, mostrando fibras arredondadas e a distribuição dos mionúcleos periféricos (seta). Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

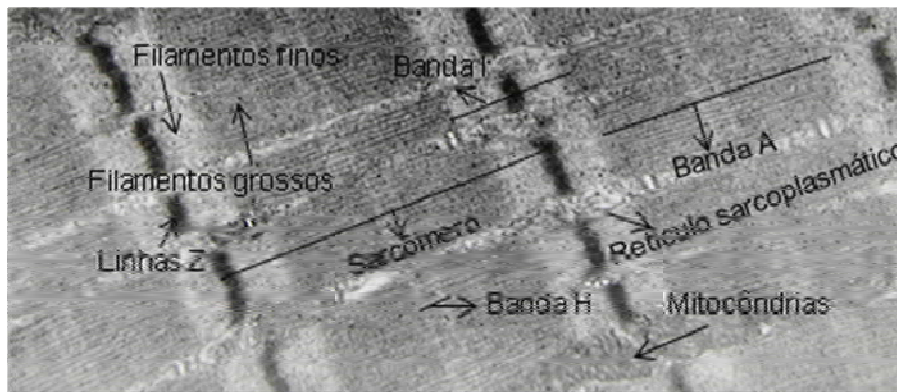


Figura 3. Micrografia eletrônica da fibra muscular demonstrando os sarcômeros e seus componentes: Bandas A, I e H; Linha Z. Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

Quanto à velocidade da contração, as fibras musculares podem ser classificadas em lentas e rápidas, conforme a velocidade de hidrólise do ATP que está relacionada com a atividade da mATPase, na porção globular da MHC (Talmadge & Roy, 1993; Schiaffino & Reggiani, 1994). Em mamíferos, as fibras musculares lentas expressam a isoforma MHC I, enquanto as rápidas expressam as isoformas MHCIIa, MHCIId e MHCIIb. No entanto, podem existir fibras que expressam duas ou mais isoformas de miosina, sendo denominadas de fibras híbridas (Staron et al., 1999, Pette & Staron, 2000).

Quanto às características metabólicas, as fibras podem apresentar metabolismo oxidativo e/ou glicolítico. As fibras de metabolismo oxidativo, geralmente apresentam contração lenta (com MHC I). Essas fibras musculares apresentam diâmetros pequenos,

muitas mitocôndrias, pouco glicogênio quando comparada as fibras de metabolismo glicolítico. Além disso, o músculo com predominância desse tipo de fibra apresenta maior número de capilares sanguíneos, maior suprimento de oxigênio e metabólitos, rápida remoção dos produtos do metabolismo e significativa produção de antioxidantes endógenos (Dubowitz & Pearse, 1960; Pette & Staron, 2001; D' Antona et al., 2006; Wolfson et al., 1995, Wolfe et al., 2006).

Já as fibras de metabolismo glicolítico são geralmente fibras de contração rápida (com MHC II). As fibras glicolíticas apresentam diâmetro maior, poucas mitocôndrias e a irrigação sanguínea e o aporte de oxigênio são menores quando comparado a fibra lenta/oxidativa. As fibras musculares do tipo II predominam em músculos que são recrutados em atividade de explosão, mas cuja atividade não pode ser prolongada porque não apresentam respaldo metabólico como as fibras oxidativas e conseqüentemente entram em fadiga mais facilmente (Hansen-Smith et al., 1976; Silau & Branchero, 1978; Gray et al., 1983; Sanger & Stoiber, 2001; Engel & Armstrong, 2003).

Os músculos podem ser classificados conforme a predominância dos tipos de fibras que os compõem; as fibras musculares, por sua vez, podem ser classificadas conforme o tipo de metabolismo (oxidativo e /ou glicolítico) e atividade de contração (rápida e/ou lenta) representada pela atividade da enzima ATPase miofibrilar da porção globular da miosina. A análise destas características pode ser realizada utilizando-se técnicas histoquímicas específicas (Figura 4).

Na figura 4A, observamos a reação de NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Tetrazolium Redutase) que possibilita evidenciar o tipo de metabolismo da fibra; na figura 4B observam-se os tipos de fibras conforme a velocidade de hidrólise do ATP, baseada na atividade da enzima ATPase miofibrilar.

A diversidade estrutural, metabólica e funcional apresentada pelo músculo esquelético confere a esse tecido alta capacidade em realizar atividades conforme a demanda funcional (Engel & Armstrong, 2003). Além disso, estudos demonstraram que o músculo exibe plasticidade fenotípica, mecanismo no qual o tecido altera suas características morfofisiológicas em resposta a estímulos, como exercício físico (Psilander et al., 2003; Magaúda et al., 2004), desnervação (Walters et al., 2000; Dow et al., 2004), imobilização (Jackman & Kandarian, 2004), envelhecimento (Larsson & Ansved, 1995) e nutrição (Jeanplong et al., 2003; Matsaka & Patel, 2009).

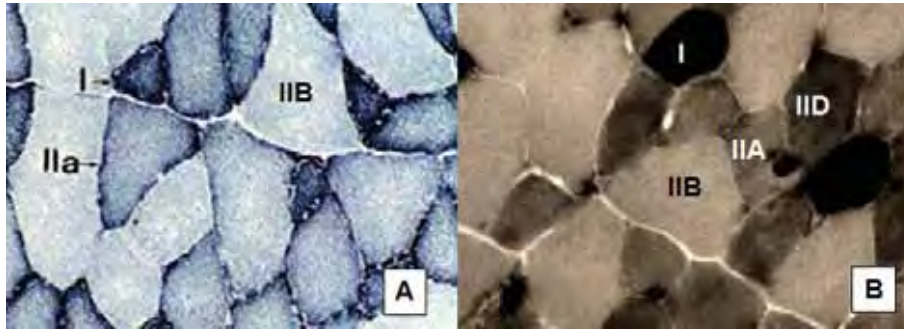


Figura 4. Corte transversal do músculo Extensor Longo dos Dedos de ratos Wistar demonstrando os tipos de fibras quanto ao metabolismo (a) e atividade da enzima ATPase miofibrilar, em meio ácido (b). Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

O mecanismo de plasticidade fenotípica muscular parece ser controlado, em parte, por fatores moleculares (Walters et al., 2000; Psilander et al., 2003; Jeanplong et al., 2003); parte desses são fatores transcricionais que controlam o desenvolvimento, o crescimento e a manutenção do tecido muscular (Bayol et al., 2004). Entre esses, destacam-se os fatores de regulação miogênica, conhecidos como MRFs (Seale & Rudnicki, 2000; Hawke & Garry, 2001; Watabe, 2001; Rescan, 2001).

Esses fatores estão envolvidos na formação inicial do músculo e durante todo o desenvolvimento ontogenético, formam heterodímeros com proteínas basic Helix-loop-Helix (bHLH). Ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como Ebox, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos (Murre et al. 1989). Os MRFs controlam a expressão de proteínas estruturais e funcionais responsáveis pela motricidade como, por exemplo, a troponina (Lin e al, 1991), a cadeia pesada de miosina (MHC) (Allen et al, 2001) e as subunidades que compõe os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Piette et al., 1990; Gilmour et al., 1991; Numberger et al., 1991; Prody & Merlie, 1991; Simon & Burden, 1993, Liu et al., 2000, Charbonnier et al., 2003).

Embora os níveis dos MRFs MyoD e Miogenina apareçam aumentados durante o desenvolvimento, também são detectados no músculo esquelético de animais adultos (Duclert et al., 1991; Alway et al., 2001) A Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, conhecidos também pela sua alta taxa oxidativa, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos, de alta taxa glicolítica (Hughes et al., 1993; Voytik et al., 1993).

4.2 Miogênese e diferenciação dos tipos de fibras musculares.

O músculo esquelético de vertebrados é formado a partir de células precursoras do mesoderma paraxial, localizadas nos somitos (Parker et al, 2003). Durante o desenvolvimento embrionário, células somíticas são comprometidas com a linhagem miogênica a partir de sinais moleculares provenientes de tecidos próximos, como a notocorda e tubo neural (Goulding et al., 1994; Williams & Ordahl, 1994; Chargé & Rudnicki, 2004).

Os somitos se diferenciam e subdividem-se para originar o dermomiótomo e o esclerótomo. Células da borda medial dorsal (BMD) do dermomiótomo migram abaixo do dermomiótomo para formar o dermomiótomo epaxial. Um evento semelhante ocorre na borda lateral ventral (BLV) do dermomiótomo, para a formação do dermomiótomo hipoaxial. As células da BLV que se separam do dermomiótomo migram para regiões de desenvolvimento dos músculos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma (células hipoaxiais migrantes) (Parker *et al.*, 2003).

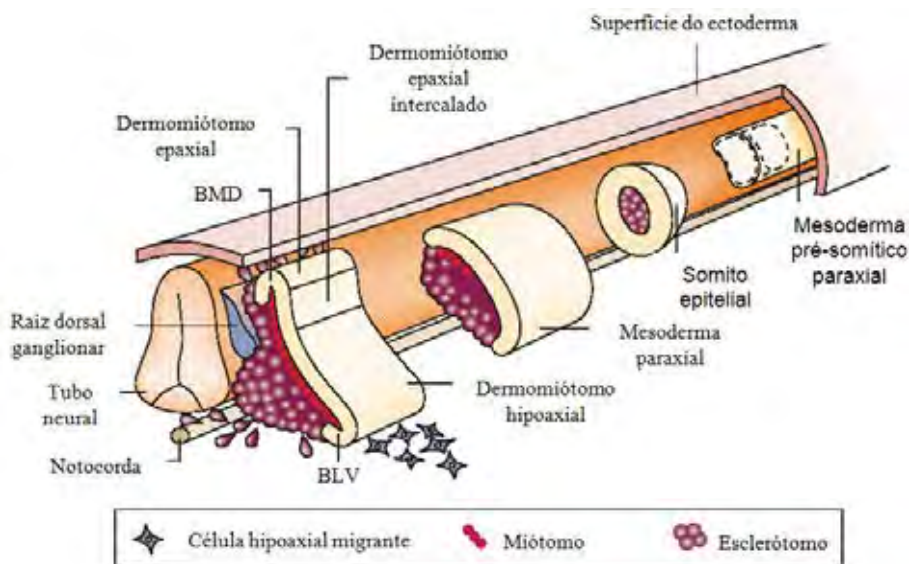


Figura 5. Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros (adaptado de Parker et al., 2003).

Durante a miogênese, proteínas de sinalização como Wnts, Sonic hedgehog (Shh) e Noggin estimulam a diferenciação inicial das células somíticas em células miogênicas, enquanto o BMP4 (proteína morfogenética óssea) é um elemento negativo nesse processo (Chargé & Rudnicki, 2004; Tsivitse et al, 2010). Essas proteínas, secretadas pela notocorda e pelo tubo neural, ativam a expressão de genes, como o Pax 3 e Pax 7, responsáveis pela identidade inicial das células comprometidas a formar o tecido muscular, as células precursoras miogênicas (Olguin et al., 2007). Essa linhagem

de células permanece em proliferação, ainda indiferenciada. Em seguida, algumas dessas células passam a expressar fatores que controlam a expressão de genes relacionados com a proliferação e diferenciação da fibra muscular (Figura 6) (Megenev & Rudnicki 1995; Olguin et al., 2007).

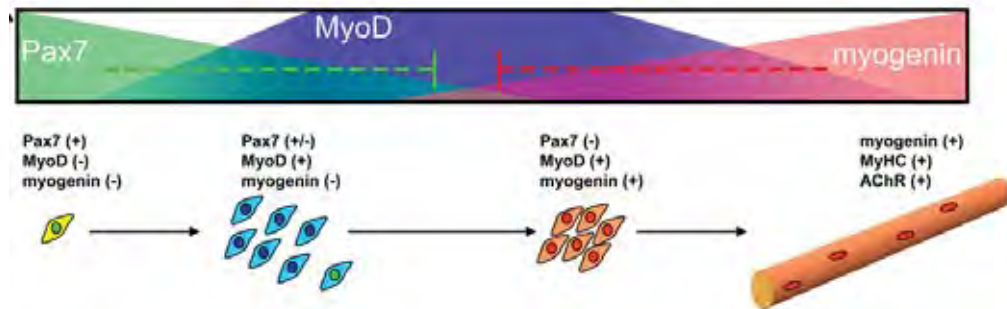


Figura 6. Expressão temporal de fatores moleculares relacionados à proliferação e diferenciação celular durante a miogênese (adaptado de Olguin et al., 2007).

Dentre esses fatores, destacam-se os fatores de regulação miogênica, do inglês *Myogenic Regulatory Factors*, ou MRFs, pertencentes à família dos fatores transcricionais basic helix-loop-helix (bHLH) que formam heterodímeros com proteínas basic Helix-loop-Helix (bHLH) e ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3') conhecidas como Ebox presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos (Murre et al., 1989). São fatores transcricionais expressos no músculo esquelético durante a miogênese, mas também se apresentam com igual importância no crescimento, manutenção e reparo muscular, sendo essenciais durante todo o desenvolvimento ontogenético (Rudnick e Jaenisch 1995; Molckentin e Olson 1996; Sabourin e Rudnick 2000).

Os MRFs MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 são MRFs comprometidos com a iniciação da programação miogênica ainda na fase de gastrulação (Hannon et al., 1992). A MyoD e Myf5 são os MRFs responsáveis pela diferenciação das células precursoras miogênicas em mioblastos e pela sua proliferação, sendo conhecidos como fatores primários (Megenev and Rudnick, 1995). Trabalho de Cossu et al. (1996) demonstrou que o tubo neural é responsável pela miogênese na metade medial do mesoderma paraxial por ativar vias dependentes de Myf5, enquanto o ectoderma dorsal é responsável por ativar a miogênese do mesoderma lateral por ativar vias dependentes de MyoD (Cossu et al., 1996; Saccone & Puri, 2010), uma vez que ambas as regiões passam a produzir estes MRFs. De fato, a ausência desses fatores em animais $MyoD^{-/-}$ e

Myf5^{-/-} acarretam em falhas na determinação miogênica, ou seja, células precursoras não assumem a localização devida na formação muscular durante embriogênese (Kablar et al., 2003).

A Miogenina e o MRF4 estão comprometidos na diferenciação dos mioblastos em miócitos que unidos formarão miotubos, fibras musculares multinucleadas ainda imaturas (Figura 6) (Megenev & Rudnicki, 1995; Chargé & Rudnicki, 2004; Zammit et al., 2006; Olguin et al., 2007). Em células transgênicas de miótomo, em que a expressão precoce de MRF4 foi produzida, foi observada a aceleração dos eventos miogênicos, incluindo a expressão de miosinas e a formação das miofibrilas (Block et al. 1996).

Nem todos os mioblastos formados a partir das células precursoras miogênicas são semelhantes (Figura 7). Podemos dividir os mioblastos em três grupos celulares: um grupo dará origem aos miotubos primários, o segundo, aos miotubos secundários, e o terceiro às células satélites que permanecem quiescentes, entre a membrana celular e a lâmina basal, sendo ativadas em situações de crescimento e reparo a danos no tecido muscular (Engel & Armstrong, 2003; Dal Pai-Silva *et al.* 2005).

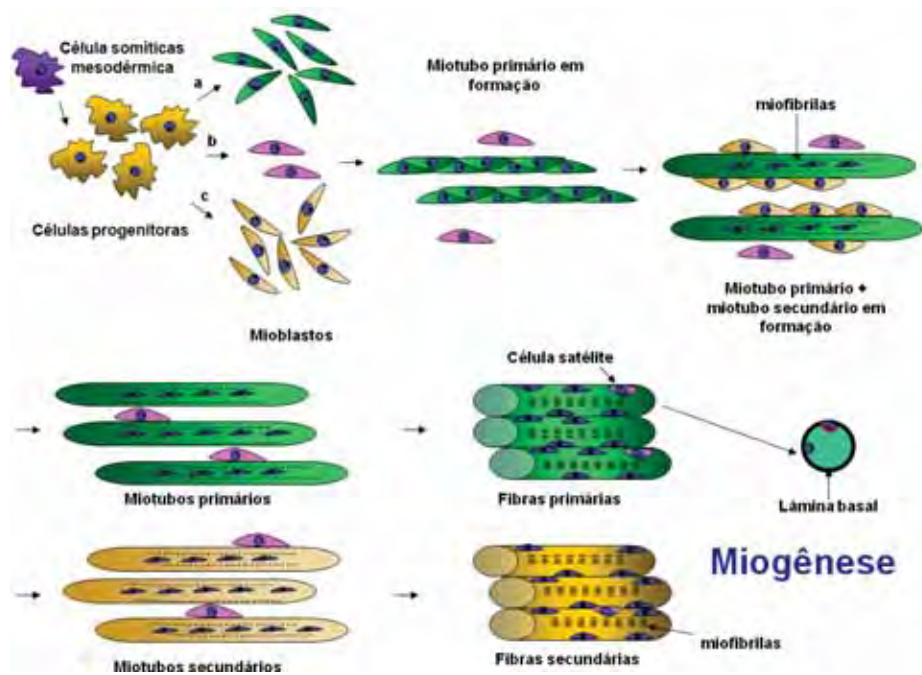


Figura 7. Formação das fibras musculares estriadas (adaptado de Dal Pai-Silva et al. 2005).

Cada miotubo é uma sucessão de miócitos que se fundem e perdem identidade passando a formar uma célula alongada multinucleada. Os miotubos primários são formados inicialmente e dão suporte para a formação dos miotubos secundários (Ontell

& Kozeka, 1984). Quando os núcleos migram para a periferia celular e as miofibrilas estão organizadas, o miotubo passa a ser chamado de fibra muscular diferenciada (Figura 7) (Dal Pai-Silva *et al.* 2005).

As miofibrilas são formadas a partir das bordas internas dos miotubos e são denominadas inicialmente como pré-miofibrilas compostas por mini-sarcômeros formados por alfa-actinina, FATZ, miotinina, filamentos de actina e proteínas associadas como tropomiosina e troponina (Stout *et al.*, 2008; Sanger *et al.*, 2010). Segundo o modelo apresentado por Stout *et al.* (2008) (Figura 8), a miofibrila nascente surge quando pré-miofibrilas alinham-se dando origem a linha Z e a titina e miosina II são incorporadas. Em seguida, observa-se o alinhamento da miosina formando a banda A em associação a outras proteínas ligadas a banda Z dando origem a miofibrila madura (Stout *et al.*, 2008; Sanger *et al.*, 2010).

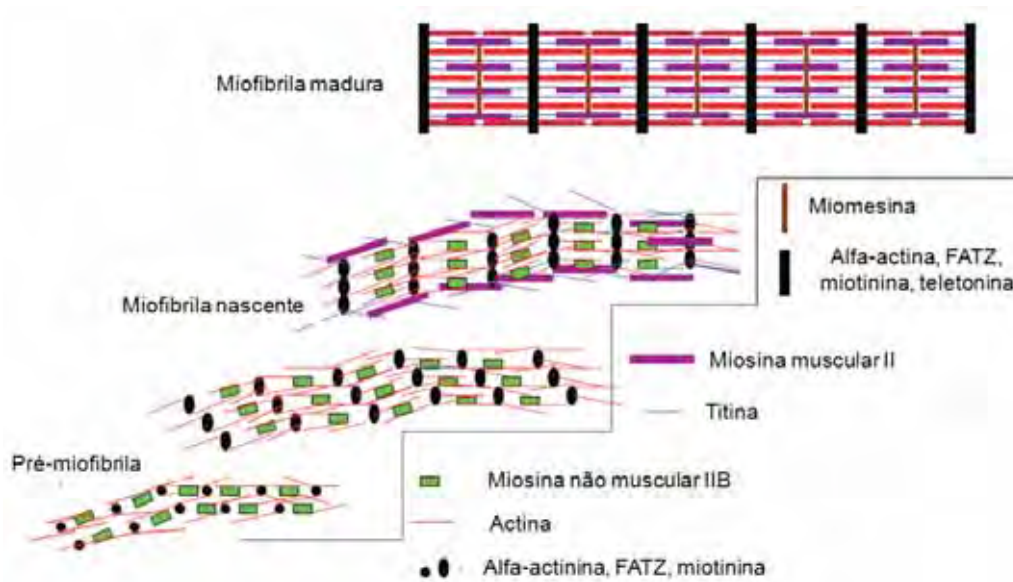


Figura 8. Formação da miofibrila (adaptada de Sanger *et al.*, 2010).

Os miotubos primários e secundários originam as fibras primárias e secundárias, respectivamente (Figura 7). As fibras primárias expressam MHCs slow, enquanto as secundárias, MHC fast (Kelly & Rubinsten, 2003).

A figura 9, adaptada de Kelly & Rubinsten, 2003, demonstra a formação das fibras dos músculos Sóleo (SOL) e Extensor Longo dos Dedos (EDL). Na fase embrionária, as fibras primárias dos dois músculos expressam MHC do tipo slow; durante o processo de crescimento, o músculo SOL continua a apresentar

predominância de fibras slow, uma vez que as fibras secundárias formadas modulam o tipo de miosina de fast para slow, caracterizando esse tipo muscular como lento. Nessa fase, no músculo EDL, as fibras primárias apresentam modulação do tipo de miosina de slow para fast, caracterizando esse músculo como rápido (Kelly & Rubinsten, 2003).

Existe uma pré-programação da proporção dos tipos de fibras musculares que irão compor um determinado tipo muscular. Essa programação é garantida pelos fatores que espacialmente e temporalmente são expressos.

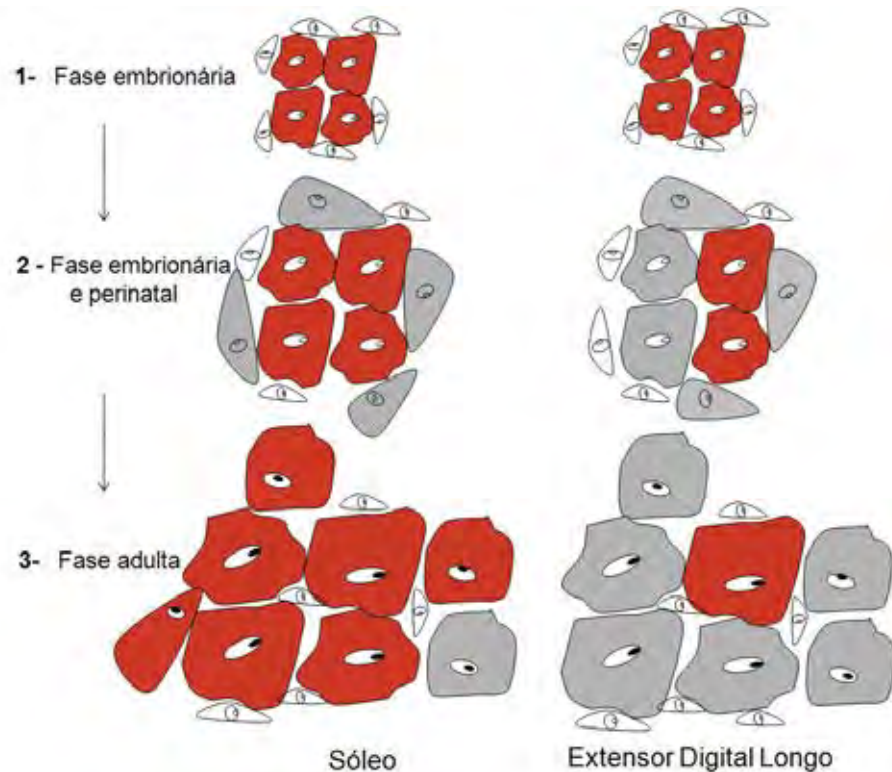


Figura 8. Desenvolvimento das fibras nos músculos Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (adaptado de Kelly & Rubinsten, 1994).

O perfil do tipo de fibra dos diferentes músculos é estabelecido durante o desenvolvimento e parece ser independente do controle pela inervação (Soileau et al., 1987). Contudo, a inervação tem papel fundamental na manutenção e modulação das propriedades dos tipos de fibras no músculo adulto. De fato, a reinervação cruzada entre o músculo Fibular Longo (músculo rápido) e o Sóleo (músculo lento) induziu a expressão de MHC fast no músculo Sóleo (Hughes et al., 1993).

Estudos têm demonstrado que a regulação da expressão diferencial de genes que garantem as características dos tipos de fibras musculares é controlada por fatores epigenéticos, os quais permitem adaptações na estrutura do cromossomo alterando o estado transcricional dos genes (Bird et al., 2007; Perdiguero et al., 2009; Baar et al.,

2010; Saccone & Puri, 2010). Já se sabe que essas alterações podem ocorrer em função de eventos como metilação do DNA e/ou metilação, acetilação e fosforilação de histonas culminando na ativação ou inativação da transcrição de genes tecido-específico. Além desses fatores, os microRNAs também intervêm na produção do fenótipo muscular, uma vez que atuam na degradação de RNAs mensageiros e na inibição da produção de determinadas proteínas. Alguns destes, como miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486 and miR-499, regulam processos fundamentais na formação dos tipos de fibras musculares (Hughes et al, 1993; Hamilton & Baulcombe, 1999; Reinhart *et al.*, 2000; Perdiguero et al. 2009; Small *et al.*, 2010).

4.3 Desenvolvimento das Junções Neuromusculares

A junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse química, anatomicamente e funcionalmente diferenciada para a transmissão de um sinal do terminal nervoso para a fibra muscular (Witzemann, 2006).

Morfologicamente, a JNM apresenta um compartimento pré sináptico, um extracelular e o pós sináptico (Figura 9) (Hall & Sanes, 1993). No compartimento pré sináptico estão presentes as vesículas contendo o neurotransmissor (acetilcolina), que são formadas no corpo celular do neurônio e são transportadas para o terminal axonal por microtúbulos em associação com as proteínas dineína e cinesina (Seagar et al., 1999).

O compartimento pós sináptico apresenta dobras juncionais. No ápice das dobras encontram-se agrupados os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) em uma densidade aproximadamente de $10^4/\mu\text{m}^2$ e no fundo das dobras estão dispostos os canais de sódio responsáveis pela geração do potencial de ação (Hall & Sanes, 1993). Os nAChRs são proteínas de membrana hetero-oligoméricas compostas por cinco subunidades (MA et al., 2007). Existem duas formas de receptores: uma forma extra-juncional imatura, presente na fibra embrionária, constituída pelas subunidades $\alpha 2$, β , δ e γ (γ AchR); e uma forma juncional madura, presente na JNM da fibra inervada, constituída pelas subunidades $\alpha 2$, β , δ e ϵ (ϵ AChR) (Shuet ze & Role, 1987).

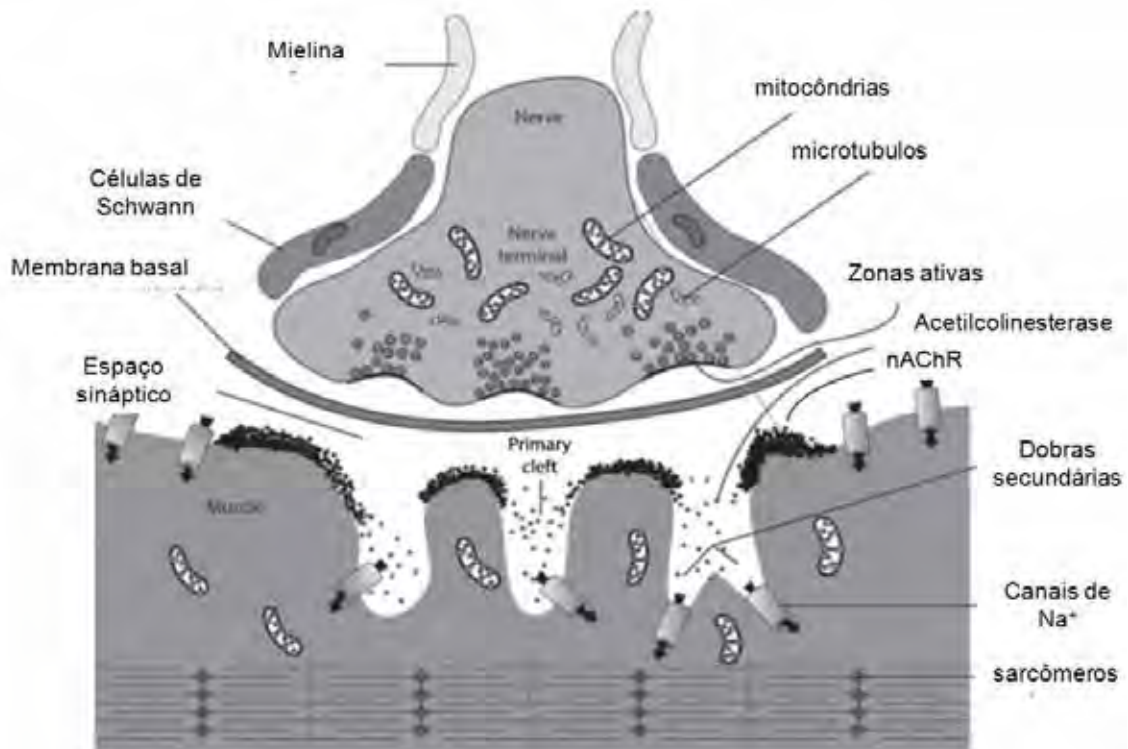


Figura 9. Organização da junção neuromuscular (adaptado de Martyn et al., 2009).

Com a chegada do potencial de ação no terminal nervoso ocorre a ativação e abertura de canais de Cálcio que permitem o influxo de Cálcio para o terminal. Esse mecanismo permite a ativação de proteínas, como a sinaptotagmina, SNAPs e syntaxina, comprometidas com a ancoragem e fusão das vesículas que contém o neurotransmissor acetilcolina na membrana pré sináptica (Seagar et al., 1999). A acetilcolina é liberada na fenda sináptica e promove a abertura de canais de Na⁺ na membrana pós sináptica; esse evento precede contração muscular (Seagar et al., 1999; Hughes et al., 2006).

Durante a embriogênese, antes que o processo de inervação tenha ocorrido, a subunidade γ AChR está distribuída difusamente na membrana das fibras musculares; durante a formação inicial da sinapse, essa subunidade está concentrada na JNM e desaparece dos sítios extra-juncionais (Engel, 1994). Em ratos, nos primeiros 14 dias de vida, a subunidade γ AChR é substituída pela ϵ AChR na JNM (Shakman & Brenner, 1978, Mishina et al., 1986, Schuetze & Role, 1987, Missias et al., 1996). A modulação das subunidades nessa fase de transição ocorre sob a influência neural, sendo a regulação da expressão diferencial dos genes das subunidades de nAChRs mediada pelos MRFs (WANG et al., 2003). Segundo Charbonnier et al (2003), durante o desenvolvimento de *Xenopus*, o Myf5 induz especificamente a produção de AchR δ ,

enquanto que MyoD e MRF4 induzem a expressão gênica da subunidade γ AChR mas não da subunidade δ AChR.

4.4 Programação fetal da Musculatura Estriada Esquelética

As propriedades morfofuncionais das fibras musculares são determinadas durante a embriogênese (Hughes et al., 1993; Bird, 2007; Baar et al., 2010), porém estímulos como a desnutrição materna pode comprometer a formação do músculo da prole, com consequências na vida adulta (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006, Mallinson et al., 2007; Toscano et al., 2008).

Segundo Fredrik et al., (2011), a restrição de proteínas durante a gestação leva a redução de transportadores de aminoácidos na placenta. Essa redução associada à baixa disponibilidade de aminoácidos circulantes para o feto promovem alterações funcionais e estruturais que permanecerão até a vida adulta. De fato, Fowden e Wooding (2006), mostraram que a quantidade de transportadores de nutrientes na placenta pode interferir no crescimento do filhote.

O fenômeno em que a mãe sofre a agressão do ambiente e geralmente o filhote sofre as consequências fisiológicas e morfológicas é conhecido como programação fetal, uma vez que o organismo durante o desenvolvimento parece se programar conforme estímulos iniciais e manifestar as consequências dessa programação a longo prazo (Lucas, 1991; Gicquel, 2009).

A programação fetal pode ter impacto estrutural, funcional e molecular, por estimular a seleção clonal adaptativa ou proliferação e diferenciação celular de forma que o número, tamanho e função sejam afetados permanentemente na prole (Lucas, 1991; Fahey et al., 2005, Malisson et al., 2007; Toscano et al., 2009). A programação fetal do músculo esquelético já foi demonstrada na prole em resposta à intervenção nutricional materna (Fahey et al., 2005, Malisson et al., 2007; Toscano et al., 2009); as alterações apresentadas no músculo parecem ser o resultado de mudanças na expressão de genes relacionados ao processo de crescimento muscular (Bayol et al., 2004, Gicquel, 2009; Zheng et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos com as alterações fetais em resposta a restrição proteica materna não estão bem esclarecidos. Contudo, estudos demonstram que a falta de nutrientes essenciais, como aminoácidos, pode afetar a expressão gênica. Essas alterações podem ocorrer na estrutura do DNA por metilação e por meio de modificação

de histonas, permitindo a inibição ou ativação da expressão de genes e proteínas musculares (Smith et al., 2006, Sinclair et al., 2007; Bar, 2010).

A programação fetal, por vezes, parece beneficiar o organismo deixando-o mais apto a superar agressões imediatas do meio; por outro lado existem relatos que muitas dessas adaptações podem deixá-los mais propensos a desenvolver patologias futuras (Hales & Barber, 1992). No tecido muscular, as alterações em resposta a programação fetal podem afetar a utilização da glicose por alterar a capacidade do músculo a responder a insulina (Phillips et al., 1995; Jensen et al., 2007)

A desnutrição durante a fase da gestação, excluindo período de lactação, pode apresentar variadas respostas no fenótipo muscular esquelético em diferentes espécies, de acordo como o tipo da dieta e período gestacional (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006; Malisson et al., 2007; Daniel et al., 2007, Toscano et al., 2009; Huber et al., 2009).

Toscano et al., (2008) demonstraram alterações musculares em ratos Wistar, cujas mães foram alimentadas com dieta restrita em proteína durante todo o período gestacional (7,8% versus 17%). Os autores observaram redução no peso absoluto dos músculos SOL (Sóleo) e EDL (Extensor longo dos dedos) nos filhotes com 25 e 95 dias de idade. Em relação às proporções das fibras musculares dos filhotes, foi observado o aumento das fibras tipo IIa no músculo SOL, e houve um aumento das fibras tipo IIb e diminuição das tipo IIa no músculo EDL.

Segundo Mallinson et al., (2007), a restrição protéica (9% versus 18%) induz alterações na proporção dos tipos de fibras da prole somente durante fases específicas da gestação em ratos; os autores observaram, no músculo SOL, aumento da proporção de fibras do tipo I, em resposta a restrição protéica nas fases iniciais da gestação, e redução na proporção das do tipo II, em resposta a restrição imposta na fase intermediária da gestação. Já, nenhuma alteração na proporção de fibras foi observada quando a restrição foi imposta durante todo o período gestacional (Malisson et al., 2007). Huber et al., (2009) observaram aumento na frequência das fibras do Tipo I e redução na frequência das do tipo II no músculo SOL de prole proveniente de mães alimentadas com redução de 30% do consumo das prenhas controles.

Fahey et al., 2005, observaram alterações na proporção de tipos de fibras do músculo vasto lateral em cordeiros cujas mães foram submetidas a 50% de restrição alimentar durante a fase de gestação envolvida com a diferenciação do músculo. Em ovinos, dieta pobre em proteínas na fase intermediária da gestação promoveu uma

diminuição no número de fibras do músculo longuíssimo dorsal na prole e um aumento da MHC II foi observada após oito meses de idade; nessa fase também foi observada diminuição da atividade da carnitina palmitoyltransferase-1, enzima responsável pela oxidação dos ácidos graxos. Os autores sugerem que a restrição de proteínas imposta durante a gestação pode conduzir a longo prazo alterações na utilização de ácidos graxos, contribuindo para o fenótipo de obesidade (Zhu et al., 2006).

Em humanos submetidos à desnutrição, o baixo peso ao nascimento pode estar associado ao desenvolvimento de diabetes tipo II e pode promover alteração na frequência dos tipos de fibras musculares, com aumento da frequência das fibras tipo IIX, no músculo vasto lateral. Esta mudança na proporção das fibras foi correlacionada com o aumento da resistência a insulina ou o desenvolvimento de diabetes tipo II (Jensen et al., 2007).

Os trabalhos demonstram que o músculo esquelético da prole pode ser afetado pela intervenção nutricional materna durante a fase gestacional, sendo que as alterações ocorridas nesse tecido podem persistir na vida adulta e predispor o animal à patologias (Phillips et al., 1995; Jensen et al., 2007).

Desta forma, o entendimento dos eventos que regulam o processo de modulação fenotípica muscular em resposta a programação fetal poderiam fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias que poderiam recuperar o músculo afetado ou mesmo para serem aplicados benéficamente para o melhor crescimento e desempenho muscular em animais de produção.

5- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos analisar os aspectos morfológicos da musculatura estriada esquelética e das junções neuromusculares (JNMs) associadas; avaliar a expressão de fatores miogênicos e dos receptores de acetilcolina, em ratos Wistar com 30 dias e 16 semanas de idade, provenientes de mães alimentadas com dieta de baixo conteúdo protéico (6%) na fase de gestação.

Foram estudados o músculo SOL (Sóleo) com predominância de fibras do tipo lento/metabolismo oxidativo e o músculo EDL (Extensor Longo dos Dedos), com predominância de fibras do tipo rápido/metabolismo glicolítico.

Em relação aos músculos, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Morfologia geral das fibras musculares por Hematoxilina e Eosina
- Caracterização dos tipos de fibras musculares pela reação histoquímica ATPase miofibrilar.
- Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real após Transcrição Reversa (qRT - PCR) dos MRFs MyoD e Miogenina;
- Quantificação da expressão protéica por Western Blotting das proteínas MyoD (36kDa) e Miogenina (38kDa);

Em relação às junções neuromusculares associadas aos músculos, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Morfologia ultraestrutural das JNMs por microscopia eletrônica de transmissão.
- A expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real após Transcrição Reversa (qRT - PCR) das subunidades α , γ e ϵ do nAChR.

6- MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental Animal do Instituto de Biociência da UNESP, Botucatu (Procolo N° 081/07-CEEA).

6.1 Manipulação das dietas.

A manipulação das dietas (Reeves, 1993) seguiu o seguinte procedimento: Foram pesados nas proporções determinadas na *Tabela.1*, os ingredientes, em pó, bem como o óleo. Em seguida, foram misturados numa misturadeira elétrica por 30 minutos e acrescentado água para que a mistura apresentasse consistência e homogeneidade ideal para a peletização. Na dieta normoprotéica, Norm Protein Diet=NP (17%), foi adicionado anilina verde comestível (Figura 1B), para diferenciá-la da dieta de baixo conteúdo protéico, Low Protein Diet=LP (6%) (Figura 1A), uma vez que os ingredientes que as constituem são claros e bastante similares.

As dietas foram peletizadas e estocadas em freezer antes da secagem em estufa a 37°C. Em seguida, as dietas foram mantidas em freezer (-20°C) até sua utilização.

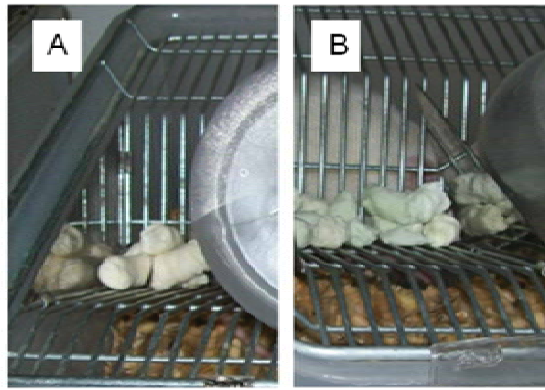


Figura 1. Dieta LP (A) e dieta NP (B).

Tabela.1. Ingredientes utilizados na confecção das dietas:

Ingredientes	Norm Protein Diet (NP) (17%) g/kg	Low Protein Diet (LP) (6%) g/kg
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Microcelulose (pH 10.1 ou pH 10.2).	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de Colina ou Bitartarato de Colina	2,5	2,5

6.2 Acasalamento dos animais.

Ratas virgens, em idade reprodutiva, foram colocadas junto a ratos, na proporção de 2:1, no período noturno e, no dia seguinte, foi realizado procedimento para detecção da prenhez. Nesse processo, foram usadas pipeta automática e ponteiras esterilizadas, utilizadas para introduzir soro fisiológico (NaCl 0,9%) na vagina da rata. A solução retirada da vagina (lavado) foi colocada em lâminas histológicas previamente

identificadas. Em seguida, as lâminas foram visualizadas em microscópio de luz, no aumento de 20X. As ratas que apresentaram células cornificadas (Figura 2B) e a presença dos espermatozóides (Figura 2E) foram isoladas e consideradas como no primeiro dia de gestação. Células cornificadas representam fase de ovulação e maior receptividade sexual. Ratas em fase reprodutiva apresentaram as fases do ciclo estral: o proestro, estro, diestro e metaestro (Marcondes et al.; 2002).

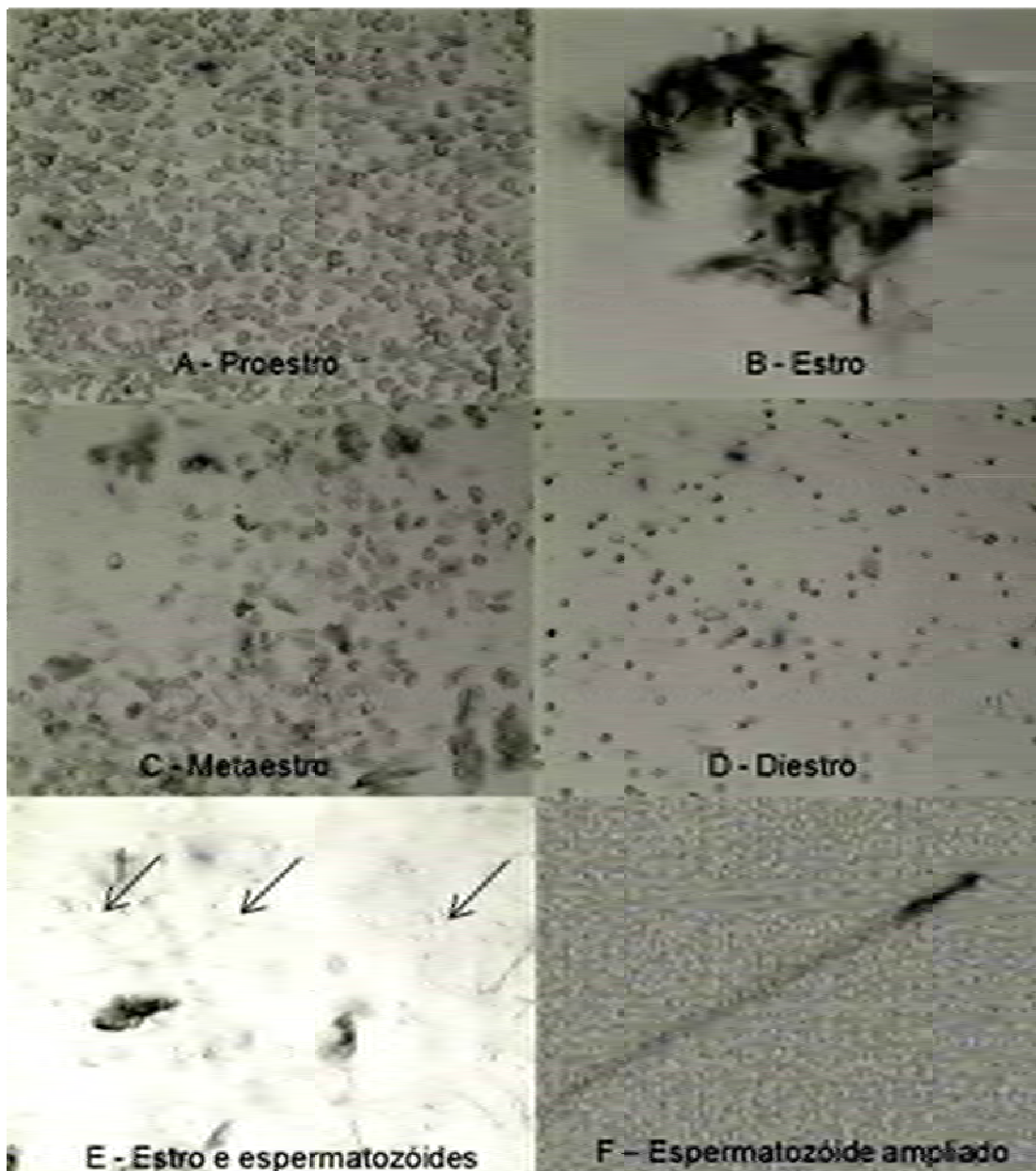


Figura 2. Fases do ciclo estral observados no lavado das ratas acasaladas (A, B, C, D e E) e a presença de espermatozóides (F) na fase estro (E). As setas apontam grupos de espermatozóides. Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

6.3 Tratamento dos grupos experimentais

A partir do primeiro dia de gestação, as ratas foram isoladas e as dietas normoprotéica e de baixo conteúdo protéico foram ofertadas (Tabela 1). Um grupo de ratas prenhes (n=8) foi alimentado com dieta contendo baixo conteúdo de proteína (6%) durante toda fase gestacional e outro grupo (n=8), alimentado com dieta normoprotéica (17%).

O consumo alimentar foi monitorado durante a gestação. Ao nascer, os filhotes da ninhada foram pesados e foram mantidos oito filhotes por rata (quatro machos e quatro fêmeas). Esse método foi adotado para garantir disponibilidade de alimento igualitária entre os filhotes de uma mesma ninhada e entre os grupos experimentais. Após nascimento dos filhotes, as dietas normoprotéica e de baixo conteúdo protéico foram substituídas por ração padrão de biotério (Labina Purina, proteína: 23%), que foi ofertado *ad libitum* durante toda a fase de lactação. A ração Labina Purina também foi administrada aos filhotes no pós desmame.

Foram estudados quatro grupos experimentais, sendo dois grupos de filhotes (NP e LP) com 30 dias de idade e outros dois (NP e LP), com 16 semanas de idade.

Grupo NP (n=8): filhotes de ratas alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) durante todo o período de gestação.

Grupo LP (n=8): filhotes de ratas alimentadas com dieta de baixo conteúdo protéico (6% de proteína) durante todo o período de gestação.

Os filhotes tiveram seus pesos corpóreos mensurados aos 30 dias e 16 semanas de idade, quando foram eutanasiados.

6.4 Eutanásia dos animais e coleta dos músculos de interesse.

Os ratos foram eutanasiados por meio de injeção intraperitoneal de uma combinação de Ketamina (50mg/ml) e Xilasina (20mg/ml) na proporção de 2:1, a seguir os músculos SOL (Sóleo) e EDL (Extensor longo dos dedos) foram dissecados, coletados e armazenados conforme o tipo de análise.

Os músculos SOL e EDL de oito animais de cada grupo experimental foram dissecados, pesados, preparados em rolha de cortiça, com tragacanty, TFM (Tissue Freezing Medium), congelados em n-Hexano, resfriados em nitrogênio líquido a -156°C e, em seguida, estocados em Biofreezer a -80°C para posterior realização de coloração de Hematoxilina Eosina e reação histoquímica da m-ATPase (atividade da ATPase

miofibrilar). Desses animais, os músculos SOL e EDL do antímero oposto de três animais de cada grupo experimental foram coletados, fixados em Karnovsky e submetidos à técnica de microscopia eletrônica de transmissão, realizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Outros oito animais de cada grupo experimental foram utilizados para a obtenção de músculos SOL e EDL para a análise de qRT-PCR (Miogenina, MyoD e subunidades α , γ e ϵ do nAChR). Estes músculos foram dissecados seguindo rigorosos cuidados para se evitar a degradação e contaminação do RNAm, colocados em tubos previamente esterilizados em autoclave e identificados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em Biofreezer (-80°C). Desses mesmos animais, foram coletados os músculos SOL e EDL do antímero oposto, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e estocados à -80°C para a análise da expressão protéica dos MRFs MyoD e Miogenina pela técnica de Western Blotting.

6.5 Estudo morfométrico das fibras musculares

Após a retirada do músculo, uma porção foi imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C . As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. Cortes histológicos ($8\ \mu\text{m}$) foram obtidos em um criostato a -20°C , sendo algumas lâminas submetidas à coloração Hematoxilina e Eosina para a análise da morfologia geral e outras utilizadas para a análise dos tipos e subtipos de fibras musculares por meio da análise histoquímica da mATPase (miofibrillar adenosine triphosphatase (Staron et al., 1999). Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin) foram determinadas a frequência dos tipos e subtipos de fibras e mensurada a área de secção transversal de aproximadamente 200 fibras (quatro campos aleatórios de cada músculo) de cada animal.

a) *Reação histoquímica de mATPase:* Para a análise histoquímica da mATPase foram utilizadas as seguintes soluções: solução de pré-incubação composta por 0,45g Acetato de sódio (54,3mM), 0,67g Barbiturato de sódio (32,6mM), com Ph ajustado para os valores de interesse (4,3 e 4,4) com ajuda de HCl, completando para 100ml de água destilada (Solução 1). A solução de lavagem foi composta por 12,1 g Tris, 100ml de CaCl_2 (0,18 M), com Ph ajustado para 7,8 (Solução 2). A solução de incubação foi determinada por Barbiturato de sódio (0,1M) – 2ml, CaCl_2 (0,18M) – 1ml, com Ph ajustado para 9,4, com adição de 15mg ATP (Solução 3). A quarta solução foi composta

por CaCl_2 1% em 1L de água destilada (Solução 4). A quinta solução foi composta por CoCl_2 2% em 1L de água destilada (Solução 5). Na sexta solução, foram utilizados barbiturato sódio - NaB (0,1M) em 1L de água destilada (feita na hora da reação) (Solução 6). A sétima solução foi composta por sulfeto de amônio (9ml) e água (100ml) (Solução 7).

Na fase de pré incubação, as lamínulas contendo os cortes dos músculos foram deixadas durante 7 minutos na Solução 1; a seguir, a fase da lavagem foi iniciada, que consistiu em deixar as lamínulas na Solução 2 durante 1 minuto; após a lavagem, iniciou-se o processo de incubação, pelo qual as lamínulas ficaram 45 minutos na Solução 3; logo em seguida, as lamínulas ficaram por três séries de 3 minutos cada na Solução 4. Seguindo o processo, as lamínulas ficaram na Solução 5 em duas séries de 1 minuto e meio; a seguir, as lamínulas foram mergulhadas na Solução 6 em seis séries de 20 minutos cada; após foi realizada a lavagem das lamínulas em água por 30 segundos. Em seguida, as lamínulas foram mergulhadas na Solução 7 por 45 segundos; por fim, ocorreu a lavagem das lamínulas em água corrente por cinco minutos e foi realizada a desidratação em bateria de álcool 90% (1minuto), 95% (1minuto), 100% (2 minuto), 100% (2minuto) e passagem pelo Xilol/álcool (1minuto) e xilol 100% (1minuto). A montagem das lâminas ocorreu em Bálsamo do Canadá. O p.H das soluções foram realizadas por meio do Phmetro DIGIMED, Modelo DM-20.

6.6 Estudo ultraestrutural das Junções Neuromusculares

a) *Localização prévia da JNM pela técnica de Esterase Inespecífica:* Para a visualização da distribuição das JNM, foram utilizados músculos SOL e EDL de ratos remanescentes, os quais foram submetidos à técnica de Esterase Inespecífica, como consta na Figura 3.

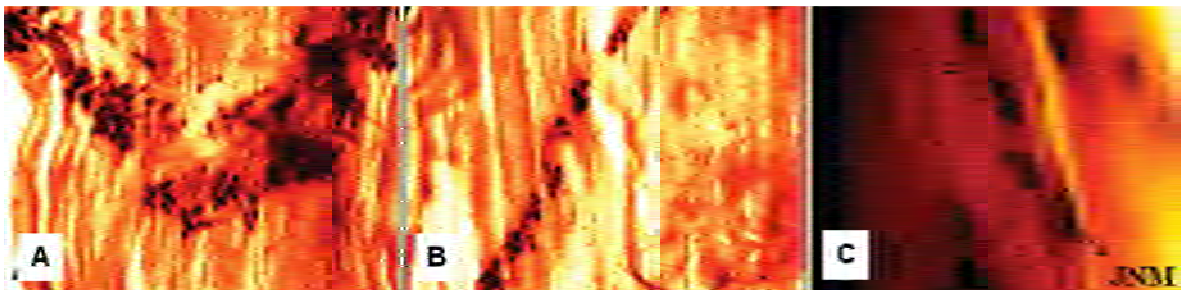


Figura 3. Técnica de Esterase Inespecífica visualizada por microscopia de luz. Músculo SOL (A) em Aumento de 10X, músculo EDL (B) em Aumento de 10X) e região da JNM contendo a atividade da acetilcolinesterase (C) em Aumento de 40X). Imagem obtida de material analisado no presente trabalho.

Foi possível observar que a distribuição das JNMs é distinta entre os dois músculos. As JNMs do músculo SOL estão distribuídas através do terço médio, enquanto no EDL, a distribuição apresenta uma conformação em espiral, abrangendo as porções proximal, média e distal do músculo. Nos dois músculos estudados as JNMs estão alinhadas transversal ou obliquamente ao maior eixo do músculo, próximas aos ramos nervosos que levam os axônios para essas terminações. Levando-se em conta a posição das JNM em relação aos feixes musculares, foi possível selecionar as áreas a serem reduzidas para análise ultra-estrutural.

b) Análise ultra-estrutural das junções neuromusculares por microscopia eletrônica de transmissão: Após a retirada dos músculos, a porção média contendo o ponto motor dos músculos SOL e EDL foi reduzida em fragmentos pequenos, os quais foram imersos em Karnovsky (glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 4,0% em tampão fosfato de sódio 0,1M, p.H 7,4) e submetidos à técnica de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica (UNESP - Botucatu).

Os tecidos foram incluídos de modo a se obter cortes longitudinais das fibras musculares e junções associadas. Através da triagem do material, segmentos musculares foram selecionados. A partir destes blocos, cortes ultra-finos foram obtidos, examinados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Philips, EM-301.

6.7 Avaliação quantitativa da expressão gênica de Miogenina, MyoD e das subunidades dos receptores de acetilcolina (α , γ e ϵ) por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).

a) Extração de RNA com TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA): A extração de RNA constituiu na homogeneização dos fragmentos musculares, previamente congelados em nitrogênio líquido, com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando

novamente, desta vez, por três minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4 °C. Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500g por cinco minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com DietiGHirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C e, finalmente, armazenado a - 80°C. Foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop para verificar a qualidade da extração e quantificar o RNA. Com base na densidade óptica (OD) 260 nm (específica para ácidos nucleicos), foi verificada a quantidade do RNA. E as razões das ODs 280/260nm e 260/240nm, nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração. As amostras utilizadas tiveram a razão 280/260nm \geq 2.0. A concentração de RNA (ng/ μ L) em cada amostra foi calculada pela seguinte expressão matemática: 40 x 70 x Absorbância a 260 nm. O valor 40 indica que para cada unidade de absorbância há 40 ng de RNA; o valor 70 indica o volume de solução de RNA quantificado. A concentração de RNA (ng/ μ L) em cada amostra foi obtida multiplicando-se por 1000 a concentração de RNA em ng/ μ L.

b) *Gel analítico de agarose para RNA:* A qualidade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 2 μ g de RNA em gel de agarose a 1%, não denaturante, corado com SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

c) *Tratamento do RNA com DNase:* Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), o RNA total, de cada amostra, destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foi acrescentado 2 μ l de tampão DNase, 2 μ l de DNase I (1U/ μ l(μ l), água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente

para completar 20 µl de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2µL de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos.

d) *Reação de Transcrição Reversa (RT)*: A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com de 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético, ao qual foi adicionado 10 µl de tampão de transcriptase reversa (10 x RT buffer), 4 µL de dNTP (25 x), 10 µL de *Randon Primers* (10 x), 2,5 µL de enzima de transcriptase reversa (50 unidades/µl), 2,5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNase out* (40 unidades/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 µL H₂O livre de RNases. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos e em seguida, por 42 °C por duas horas e, em seguida, o volume final do produto da RT ajustado para 200 µL. Em seguida, estocadas em freezer a -20°C.

e) *Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR)*. A PCR em Tempo Real foi realizada com o *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 2 µL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de *Power SYBR[®] Green Mix* (2,5 x) e 400 nM de cada primer, em um volume final de 25 µL. Os primers para os genes alvos e de referência foram obtidos através do software Primer3, disponível no endereço eletrônico <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) e sintetizados pela Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) (tabela 2). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se os seguintes parâmetros: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Tabela 2. Primers dos genes alvos e de referência utilizados para quantificação da expressão gênica (RT-PCR).

<i>Gene</i>	<i>Nº de Acesso no GenBank</i>	<i>Seqüência do primer (5' – 3')</i>
Gamma 1 (γ)	X06364	F: AACGCAAGCCCCTCTTCTAT R: GAGGATCGCAACTGAGGAGA
Alpha 1 (α)	NM_024485	F: TCCCTTCGATGAGCAGAACT R: AGCCGTCATAGGTCCAAGTG
Epsilon 1 (ϵ)	NM_017194	F: GGCTCAACTTCAGCAAGGAC R: AGCCATACATGTTCCGGAAGG
MyoD	NM_176079	F: TTTTTCATGCGACTCACAGC R: GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
Miogenina	M24393	F: GTCTTTTCCGACCTGATGGA R: ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
ARBP*	NM_022402	F: CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG R: AACAGTCGGGTAGCCAATCTG
TBP*	NM_001004198	F: GCCACGAACAACCTGCGTTGAT R: AGCCCAGCTTCTGCACAACCTCTA
GAPDH*	AB017801.1	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTT
HPRT*	NM_000194.1	F: TGACACTGGCAAAAACAATGCA R: GGTCCCTTTTACCAGCAAGCT
ACTB*	NM_031144	F: CAGGTCATCACTATCGGCAATG R: TTTCATGGATGCCACAGGATTC

F: primer senso; R: primer anti-senso. GAPDH: Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase, TBP: TATA binding box protein, ARBP: Acidic ribossomal phosphoprotein, HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase, ACTB: Actin beta. * Genes testados como genes de referência (housekeeping).

Para cada amostra, foi feito um gráfico de amplificação mostrando o aumento da fluorescência do *SYBR[®] Green* (ΔRn) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo onde a fluorescência, proporcional ao aumento da quantidade do produto da reação, cruza o limiar de detecção (*cycle threshold* - C_T), utilizando-se o software *7300 System SDS* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Para verificar a eficiência dos ensaios, curvas padrões relativas para cada gene foram plotadas tendo o C_T (eixo y) versus o *log* de uma série de seis diluições (10x) de uma mistura inicial contendo quantidades iguais de cDNA de todas as amostras de padronização (eixo x). A

inclinação de uma curva padrão (a) descreve a eficiência da PCR e, é definida pela equação: $C_T = a (\log_{10} Q) + b$, onde Q é a quantidade inicial e b é a interseção do eixo y. Quando a amplificação da PCR possui 100% de eficiência, resultando na duplicação da quantidade de produto a cada ciclo, a inclinação (a) foi -3,32 (Medhurst et al., 2000). Para garantir a qualidade das medidas, foram feitos ensaios que incluíam um controle negativo da PCR (amostra substituída por água livre de RNase) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA das amostras utilizadas para padronizações).

O método de análise utilizado foi o método do Ct comparativo (ΔCt) (Livak & Schmittgen, 2001). Esse método utiliza o valor de expressão de uma amostra como referência, chamada de calibrador. Os valores da expressão das outras amostras são sempre em relação ao valor de expressão do calibrador. Dessa maneira, obtém-se o resultado da expressão relativa. Um dos requisitos para utilizar o método do ΔCt é que a eficiência da amplificação deve ser igual entre todos os genes. Para verificar a eficiência das amplificações foi feito um teste de validação dos ensaios, utilizando as curvas padrão de cada gene (Livak & Schmittgen, 2001).

f) Normalização dos resultados e Quantificação relativa dos genes de interesse: Na normalização dos resultados, os valores obtidos foram corrigidos, segundo o método desenvolvido por Vandesompele et al. (2002), pelo fator de normalização gerado através da expressão de três possíveis genes de referências. Para a realização da normalização e quantificação relativa dos genes, os dados foram importados para o programa DataAssist™ v2.0 Software da Applied Biosystems.

6.8 Western Blotting para as proteínas MyoD e Miogenina.

a) Extração de proteínas: As amostras de tecido muscular congelado (SOL e EDL) de todos os grupos foram homogeneizadas em Polytron com 400-500 μ L de tampão de lise. Esse tampão foi constituído por Fluoreto de sódio (100mM), Pirofosfato de sódio (10mM), Ortovanato de sódio (10mM), Trisma Base Ph 7,5 (100mM), ácido etilenodiamino tetra-acético- EDTA (10mM), fluoreto de fenilmetano sulfonila-PMSF (2mM) diluído em álcool etílico, Aprotinina 0,1mg/ml e água deionizada.

Após a sonificação, foi adicionado 10% do volume adicionado de tampão de lise de Triton (10%) em cada amostra durante 30 minutos. Em seguida, os

homogenizados foram transferidos para eppendorfs previamente identificados e centrifugados a 11.000 rpm, por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C.

b) *Tratamento com Laemmli:* As amostras foram tratadas com Laemmli correspondente a 50% do sobrenadante utilizado. Em seguida as amostras com Laemmli foram levadas a banho seco de 95-100°C por 5 minutos. Após tratamento foram estocadas novamente em freezer -80°C.

c) *Quantificação das proteínas:* Para saber a quantidade total de proteínas em cada amostra, foi realizada a quantificação de proteínas pelo Método de Bradford em placa de Elisa, utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA 0,1%) como proteína da curva padrão. Após leitura em espectrofotômetro, foi possível ajustar as proteínas das amostras para 50µg/µl e dessa forma aplicar essa concentração no gel.

d) *Preparação do gel para eletroforese:* As amostras foram submetidas à eletroforese em gel 12%. O gel foi constituído por água, tampão Resolving (SDS 2%) e Stacking (SDS 2%), acrilamida 40%, Temed e persulfato de amônio (APS 10%). O Temed e APS atuam como catalizadores da reação, dessa maneira são os últimos componentes a serem adicionados. Depois de realizada a solução do gel, este foi imediatamente colocado no suporte de vidro com espessura de 1,5mm para o gel e pente de 15 well. Após polimerização do gel, as amostras foram adicionadas, juntamente com o ladder como padrão de corrida de proteínas (kDa). O peso molecular para MyoD é de 38 kDa, enquanto que para Miogenina é de 36kDa. As proteínas então foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE), dentro de uma cuba eletrolítica.

e) *Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose:* Em seguida foi montado sistema para transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). O gel ficou face a face com a membrana, e uma corrente elétrica foi aplicada entre grandes placas. Esse mecanismo transferiu a proteína exatamente na posição original que estava no gel. Para verificar se toda a proteína contida no gel foi transferida para a membrana, o gel foi corado por 1 hora em Azul de bromofenol e descartado.

f) *Bloqueio, incubação com anticorpos e revelação:* As membranas foram bloqueadas com leite desnatado (5% para Miogenina e 3% para MyoD) diluído em TBS-Tween por 1h e 30 minutos para Miogenina e 1h para MyoD e então, foram lavadas em solução basal e em seguida, incubadas overnight com anticorpo primário de coelho de acordo com as especificações do fabricante. Após lavadas em solução basal,

as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho conjugados com *horseradich peroxidase* (HRP) por 1 hora e a visualização foi realizada por detecção quimioluminescente ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), meio constituído por peróxido e luminol. A quantificação foi realizada por densitometria, por meio da utilização do programa Image J 1.42q, USA.

g) *Realização de stripping de membrana:* Para reutilização das membranas reveladas, foi utilizado 10 ml de buffer Stripping em cada membrana, a qual foi lavada em agitador por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas com solução basal e estocadas para reutilização.

h) *Normalização dos resultados:* Para correção dos resultados obtidos de MyoD e Miogenina, nos músculos SOL e EDL de todos os grupos, foi realizada a análise da proteína Beta actina (43KDa) que geralmente não varia, independente do tratamento. Os resultados foram expressos como [intensidade_{MRF}/intensidade_{β-actina}].

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HAKEEM AK, THOMAS R MAGEE, MINA DESAI, et al. Mechanisms of impaired nephrogenesis with fetal growth restriction: altered renal transcription and growth factor expression. **Am J Obstet Gynecol**, v.199,p:252.e1–252.e7, 2008.
2. ALLEN DL, SARTORIUS CA, SYCURO LK, LEINWAND LA. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. **J Biol Chem.**, v. 276(47), p:43524-33, 2001.
3. ASHTON, N. Perinatal development and adult blood pressure. **Braz J Med Biol Res**, v.33(7), p:731-740, 2000.
4. BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. **Acta Physiol**, v.199, p:477–487, 2010.
5. BANKS GB., FUHRER C, ADAMS ME, FROEHNER S.C. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: Requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. **J Neurocytology**, p:709-726, 2003.
6. BARKER, D. J., J. G. ERIKSSON, T. FORSEN, AND C. OSMOND. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. **Int. J. Epidemiol.** v.31, p:1235-1239, 2002.
7. BARLOW BK; RICHFIELD EK; CORY-SLECHTA DA; THIRUCHELVAM M A Fetal Risk Factor for Parkinson's Disease. **Dev Neurosci.** v. 26, p:11–23, 2003.
8. BAYOL S., JONES D., GOLDSPINK G., STICKLAND N. C. 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, p:331–339, 2004.

9. BEDY KS, BIRZGALIS AR, MAHON M, SMART, JL, WAREHAM, AC - Early life undernutrition in rats. 1 - Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and re-fed adult animal. **Brit J Nutr**, v.47, p.417-431, 1982.
10. BEERMANN D. H. Effects of maternal dietary restriction during gestation and lactation, muscle, sex and age on various indices of skeletal muscle growth in the rat. **J Anim Sci**, v.57 p:328-337, 1983.
11. BENDER A, BENDER M. Muscle fiber hypertrophy with intact neuromuscular junctions. **Neurol (Minneapolis)**, v.27, p: 206-12, 1977.
12. BHASIN, K K S, NAS, A V, MARTIN L J, DAVIS R C, DEVASKAR S U, LUSIS A. Maternal Low-Protein Diet or Hypercholesterolemia Reduces Circulating Essential Amino Acids and Leads to Intrauterine Growth Restriction. **Diabetes**. v.58 p:559-566, 2009.
13. BRAMELD, J.M. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. **Br J Nutri**, v.98, p.292–299, 2007.
14. CAMPOS GE, LUECKE TJ, WENDELN HK, TOMA K, HAGERMAN FC, MURRAY TF, RAGG KE, RATAMESS NA, KRAEMER WJ, STARON RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol**, v. 88, p:50–60, 2002.
15. CHARBONNIER F, GASPERA B, DELL, ARMAND ANNE-SOPHIE, LÉCOLLE S, LAUNAY T, GALLIEN CALUDE-LOUIS, CHANOINE C. Specific Activation of the Acetylcholine Receptor Subunit Genes by MyoD Family proteins. **J Biol Chem**. v.278(35), p:33169-33174, 2003.
16. CHARGÉ, S.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev.**, v.84, n.1, p:209-238, 2004.
17. CHEN J-H, MARTIN-GRONERT MS, TARRY-ADKINS J, OZANNE SE. Maternal Protein restriction Affects Postnatal Growth and the Expression of Key Proteins Involved in Lifespan Regulation in mice. **Plos One**. v.4(3),4950, 2009.
18. COSSU G., KELLY R, TAJBAKHS, S., DONNA DI. VIVARELLI E., BUCKINGHAM M. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm **Development** v.122, p:429-437, 1996.
19. D'ANTONA G, LANFRANCONI F, PELLEGRINO MA, BROCCA L, ADAMI R, ROSSI R, MORO G, MIOTTI D, CANEPARI M, BOTTINELLI R Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. **J Physiol** v.570(3), p:611–627, 2006.
20. DAHRI S, REUSENS B, REMACLE C, HOET JJ. Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. **Proc Nutr Soc**; v.54, p: 345-356, 1995.
21. DAL PAI-SILVA M, DAL PAI V, CARVALHO RF (2004). Células musculares estriadas esqueléticas. *Célula: Uma abordagem multidisciplinar*. p.83-94, 2005.
22. DANIEL C. T. R., BRAMELD J. M, CRAIGON J., SCOLLAN . D. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition *Z. J. Anim. Sci.*v. 85, p.1565–1576, 2007.

23. DANIELS MP Intercellular communication that mediates formation of the neuromuscular junction. **Mol Neurobiol.** v.14(3), p:143-170, 1997.
24. DECHIARA TM, BOWEN DC, VALENZUELA DM, SIMMONS MV, et al.. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. **Cell**; v.85, p:501–512, 1996
25. DESAI, M, BABU,J. ROSS, M. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** , v.293, p.R2306–R2314, 2007.
26. DOBBINS GC, ZHANG B, XIONG WC, MEI L The Role of the Cytoskeleton in Neuromuscular Junction Formation. **J Mol Neurosci.** v.30, p:115-117, 2006.
27. DOW DE, CEDERNA PS, HASSET CA, KOSTROMINOVA TY et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle Nerve.** v.30(1):77-86, 2004.
28. DUBOWITZ V & PEARSE AG A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochem cell biol** v.2, p:105-117,1960.
29. DWYER, C. M., N. C. STICKLAND, AND J. M. FLETCHER. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. **J. Anim. Sci.** v.72, p:911-917. 1994.
30. ELLGAARD, L., AND A. HELENIUS. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 4, p:181-191, 2003.
31. ELLIOTT A AND OFFER G. Shape and flexibility of the myosin molecule. **J Mol Biol** v.123, p:505-519, 1978.
32. ENGEL, A.G. & S.M. SINE. Current understanding of congenital myasthenic syndromes. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.5, p:308–321, 2005.
33. ERMILOV LG, MANTILLA CB, ROWLEY KL, SIECK GC. Safety factor for neuromuscular transmission at type-identified diaphragm fibers. **Muscle Nerv.** Jun; v.35(6), p:800-3, 2007.
34. FAHEY, A.J.; BRAMELD, J.M.; PARR. T.; BUTTERY, P.J.The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. **J. Anim. Sci,** v.83, p:2564-2571, 2005.
35. FEINBERG AP .Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature.** v.447, p:433-440, 2007.
36. FLUCK M, HOPPELER H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** v. 146, p:160-161, 2003.
37. FORSDAHL, S. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? **Brit J Prev Soc Med,** v. 31, p: 91-95, 1967
38. FORSDAL, A. Living conditions in childhood and subsequent development of risk factors for arteriosclerotic heart disease. The cardiovascular survey in Finnmark. **J Epidemiol Community Health.** v.32, p: 1974-1975, 1978.
39. FOWDEN AL,WARD JW, WOODING FP et al.. Programming placental nutrient transport capacity. **J Phys;** v.572, p:5–15, 2006.

40. FOWDEN, A.L.; GIUSSANI, D.A.; FORHEAD, A.J. Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. **Physiol**, v.21, p.29-37, 2006.
41. GAUTAM M, NOAKES PG, MOSCOSO L, RUPP F, SCHELLER RH, MERLIE JP, et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. **Cell**, v.85, p:525–535, 1996.
42. GAUTAM M, NOAKES PG, MUDD J, NICHOL M, et al. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. **Nature**, v.377, p:232–236, 1995
43. GICQUEL, C., EL-OSTA, A. & LE BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. Best practice & research. **Clin Endocrinol metabolism**, v. 22(1), p:1-16, 2008.
44. GILMOUR BP, FANGER GR, NEWTON C, et al. Multiple bindings sites for myogenic regulatory factors are required for expression of the AchR gamma-subunit gene. **J. Biol Chem**. v.266, p:19871-19874, 1991.
45. GLORE S.R.; LAYMAN D.K. Loss of tissues in female rats subjected to food restriction during lactation or during both gestation and lactation. **J. Nutr.** v. 115, p:233-242, 1985.
46. HALES CN; BARKER DJ.; CLARK PM; et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age. **BMJ**. V.303, n.6809, p. 1009-1022, 1991.
47. HALES, C.N; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diab**. v.35, p.595-601, 1992.
48. HALL, Z. W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, v.72, p. 99-121, 1993.
49. HALSETH A E., BRACY D P, WASSERMAN D H. Functional limitations to glucose uptake in muscles comprised of different fiber types. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.280, p.994-999, 2001.
50. HANSEN LL, TINGEY KJ, NAVE BT, WANG CL. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. **J Endocrinol** v. 177, p.235-41, 2003.
51. HAWKE TJ, GARRY DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 9, p:534-551, 2001.
52. HIROSHI HIRANO. Ultrastructural Study on the Morphogenesis of the Neuromuscular Junction in the Skeletal Muscle of the Chick. *Zeitschrift für Zellforschung*, v. 79, p:198—208, 1967.
53. HUBER, K., MILE J. L., NORMAN, A.M., THOMPSON, N.M., DAVISON, M., BREIER, B.H Prenatally Induced Changes in Muscle Structure and Metabolic Function Facilitate Exercise-Induced Obesity Prevention **Endocrinology**. v.150(9), p:4135–4144, 2009.
54. HUGHES S.M., TAYLOR J.M., TAPSCOTT S.J., GURLEY C.M., CARTER W.J., PETERSON C.A. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. **Development** v.118, p:1137–1147, 1993.
55. HUXLEY HE Structural changes during muscle contraction. **Biochem J** v.125(4), p:85, 1971.

56. JACKMAN, R.W., KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 287, p. 834–43, 2004.
57. JENSEN CB., STORGAARD H, MADSBAD S, RICHTER EA, VAAG AA. Resistance in Young Men with Low Birth Weight Altered Skeletal Muscle Fiber Composition and Size Precede Whole-Body Insulin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 92, p:1530-1534, 2007.
58. JIN T E, ANTON WERNIG, WITZEMANN V. Changes in acetylcholine receptor function induce shifts in muscle fiber type composition. **FEBS Journal** , v.275, p:2042–2054, 2008.
59. KABLAR B, KRASTEL K, TAJBAKHS S, et al. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. **Dev Biol.** v.258(2), p:307-18, 2003.
60. KELLY AM; RUBINSTEIN NA, 2003. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. **Myology.** 3ª edição , v.1, p: 87-103,2003.
61. KEVIN D., SINCLAIR R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo Singh **Theriogenology**, v. 67, p:43–53, 2007.
62. KRONNIE GT.,REGGIAN C. Skeletal muscle fibre type specification during embryonic development. **J Muscle Res and Cell Motility**, v. 23, p:65–69, 2002.
63. LANGLEY-EVANS A.C.; BELLINGER MCMULLEN S. Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. **Maternal and Child Nutrition**, v. p: 142–148, 2005.
64. LANGLEY-EVANS, S.C. (2004) Fetal programming of adult disease: an overview. In: *Fetal Nutrition and Adult Disease Programming of Chronic Disease Through Fetal Exposure to Undernutrition* (ed. SC Langley-Evans), pp 1–20. CABI: Wallingford, UK.2004.
65. LANGLEY-EVANS, S.C. Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition. P. 01-16, 2004
66. LANGLEY-EVANS, S.C.; WELHAM, S.J.; JACKSON. A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sci**, v. 64(11), p:965-74, 1999.
67. LIN H, YUTZEY HK; KONIECZNY SF. Muscle-Specific Expression of the Troponin I Gene Requires Interactions between Helix-Loop-Helix Muscle Regulatory actors and Ubiquitous Transcription Factors. **MCB**, v. 11, p: 267-280, 1991.
68. LIU M; JENNIFER E. STEVENS-LAPSLEY; JAYARAMAN A, et al. Impact of treadmill locomotor training on skeletal muscle IGF1 and myogenic regulatory factors in spinal cord injured rats. **Eur J Appl Physiol**, v.109, p:709–720, 2010.
69. LIU S, SPINNER DS, SCHMIDT MM, et al. Interaction of MyoD family proteins with enhancers of AchR subunit genes in vivo. **J. Biol Chem.** v.275, p:41364-41368, 2000.
70. LIVAK, K.J. AND SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. **Methods**, v.25, p:402–408, 2001.

71. LOPES FS; CARVALHO RF; CAMPOS GER et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure **Int. J. Exp. Path.** v. 89, p: 216–222, 2008.
72. LOUGHNA PT, BROWNSON C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. **FEBS Letters** v. 390 p: 304-306, 1996.
73. LOWEY S, SLAYTER HS, WEEDS AG, BAKER H. Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **J Mol Biol** v. 42(1), p:1-29, 1969.
74. LUCAS, A. Programming in early nutrition in man. **Ciba Foun Symp**, v. 156, p. 38-53, 1991.
75. MAGAUDDA, L.; MAURO, D.D.; TRIMARCHI,et al. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic Appl myol**, v.14(1), p:17-21, 2004.
76. MALLINSON, J.E.; SCULLEY, D.V.; CRAIGON, J.; et al. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. **Br J Nutri**,v.98, p.292–299, 2007.
77. MARTINEZ PF, OKOSHI K, ZORNOFF LA, et al. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. **Med Sci Monit**, v.30, p:374-383, 2010.
78. MARTYN, J.J., FAGERLUND, M.J. & ERIKSSON, L.I. Basic principles of neuromuscular transmission. **Anaesthesia**, v.64, p:1-9, 2009.
79. MASTAGLIA, L.F; DETCHANT, L.W. Skeletal Muscle Pathology. 2º edição. Chuechill Livingstone, 1992
80. MATHERS, J.C., MCKAY, J.A. Epigenetics - potential contribution to fetal programming. **Adv Exp Med Biol**. v.646, p:119-23, 2009.
81. MATSAKAS A, PATEL, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli **Histol Histopathol** v.24, p.611-629, 2009.
82. MCCOMAS AJ. Skeletal Muscle: Form and Function. Champaign, III: Human Kinetics. McKenzie DC (1999) Markers of excessive exercise. **Can J Appl Physiol** 24, p:66-73, 1996.
83. MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem Cell Biol**, v.73, n.9-10, p.723-732, 1995.
84. MESQUITA, J.A.R. GONTIJO AND P.A. BOER. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult Life . **Braz J Med Biol Res**, v.43(11), p:1010-1018, 2010.
85. MISHINA, M., T. TAKAI, K. IMOTO, M. NODA, T. TAKAHASHI, S. NUMA, C. METHFESSEL, AND B. SAKMANN. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. **Nature**. v. 321, p:406-411, 1986.
86. MISSIAS AC, CHU GC, KLOCKE BJ, SANES JR, MERLIE JP. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR c-to- switch. **Developmental Biology**, v.179, p:223–38, 1996.

87. MOLKENTIN JD, OLSON EN. Defining the regulatory networks for muscle development. **Curr Opin Genet Dev** v.6, p:445-53, 1996.
88. MURRE, C.; McCAW, P.S.; VAESSIN, H. et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, v.58, n.3, p.537-544, 1989.
89. Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole, São Paulo: p83-94, 2005.
90. NATHANIESZ, PW. Fetal Programming: Implications for Development and Developmental Disability. **Developmental Disabilities Bulletin**, v. 28(2), 2000.
91. NUMBERGER M, DÜRR I, KUES W, KOENEN M, WITZEMANN. Different mechanisms regulate muscle – specific AchR gama- and epsilon- subunit gene expression. **EMBO J**. v.10, p:2957-2964, 1991.
92. OLGUIN HC, YANG Z, TAPSCOTT SJ, OLWIN BB. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. **J Cell Biol**, v.177, p:769-79, 2007.
93. ONTELL, M.; KOZEKA, K. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. **Am J Anat**, v.171, n.2, p.133-148, 1984.
94. OZANNE SE, OLSEN GS, HANSEN LL, TINGEY KJ, NAVE BT, WANG CL. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. **J Endocrinol**. v. 177, p:235-41, 2003.
95. PARKER, M.H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nat Rev Genet**, v.4, n.7, p.497-507, 2003.
96. PERDIGUERO, E.; SOUSA-VICTOR, P.; BALLESTAR E., MUÑOZ-CÁNOVES P. Epigenetic regulation of myogenesis. **Epigenetics** v.4:8, p:541-550; November 16, 2009.
97. PETTE D & STARON RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochem cell biol** v.115, p:359-372, 2001.
98. PETTE D. AND STARON R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc. Res. Tech.** v.50, p:500-509 (2000).
99. PETTE D. AND STARON R.S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochem cell biol** v. 115, p:359-372, 2001.
100. PHILLIPS, D. W., BARKER, D.J.P., HALES, C. N., FIRST, S. & OSMOND, C. Thinness at birth and insulin resistance. **Diabetologia** v.37, p:150–154,1994.
101. 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
102. PIETTE J, BESSEREAU JL, HUCHET M, CHANGEUX JP. Two adjacent MyoD1 – binding sites regulate expression of the AchR alpha – subunit gene. **Nature**. v.345, p:353-355, 1990.
103. PORRELLO E R., WIDDOP RE, DELBRIDGE L. Early origins of cardiac hypertrophy: Does cardiomyocyte attrition program for pathological ‘catch-up’ growth

of the heart? **Proceedings of the Australian Physiological Society** . v.39, p:51-59, 2008.

104. PRODY CA, MERLIE JP. A developmental and tissue-specific enhancer in the mouse skeletal muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene regulated by myogenic factors. **J. Biol Chem.** v.266(33), p:22588-96, 1991.

105. PUN S, SIGRIST M, SANTOS AF, RUEGG, MA.; SANES JR, JESSELL, TM; ARBER, S.; CARONI, P. An Intrinsic Distinction in Neuromuscular Junction Assembly and Maintenance in Different Skeletal Muscles. **Neuron**, v.34, p:357–370, 2002.

106. REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nut.** v.123, p:1939-51, 1993.

107. REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR & RUVKUN G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v.403, p:901-906, 2000.

108. RESCAN, P.Y. Regulation and function of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 130, p:1-12, 2001.

109. SACCONI V; PURI PL. Epigenetic regulation of skeletal myogenesis. **Organogenesis** v. 6:1, p:48-53; 2010.

110. SACKS, MD. Determinants of Fetal Growth David A. **Current Diabetes Reports**, v. 4, p:281–287, 2004.

111. SANGER, JW; WANG, J; FAN, Y; WHITE, J; AND JEAN M. SANGER Assembly and Dynamics of Myofibrils. **J Biomedic Biotech**, Volume 2010, Article ID 858606, 8 pages doi:10.1155/2010/858606, 2010.

112. SCHIAFFINO S & REGGIANI C Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J Appl Physiol** v.77(2), p:493–501, 1994.

113. SCOTT W, STEVENS J, BINDER-MACLEOD SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* v.81(11), p:1810-1816, 2001.

114. SEAGAR M, LEVEQUE C, CHARVIN N, MARQUEZE B, MARTIN-MOUTOT N, BOUDIER JA, et al. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. **Phil Trans R Soc Lond B** v.354, p:289–297, 1999.

115. SEALE P, RUDNICKI MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Exp Biol** v.218, p:115-124, 2000.

116. SIMON AM, BURDEN SJ. An Ebox mediates activation and repression of the acetylcholine receptor delta – subunit gene during myogenesis. **Mol Cell Biol.** v.;13(9), p:5133-40, 1993.

117. SINCLAIR SK, LEA RG, REES WD, YOUNG LE. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. **Soc Reprod Fertil Suppl** v.64, p:425-43, 2007.

118. SMALL EM, O'ROURKE JR, MORESI V, SUTHERLAND LB, MCANALLY J, GERARD RD, RICHARDSON JA, OLSON EN. Regulation of PI3-kinase/Akt

- signaling by muscle-enriched microRNA-486. **Proc Natl Acad Sci** v.107, p:4218-4223, 2010.
119. SNOECK A, REMACLE C, REUSENS B, HOET JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. **Biol Neonate** v. 57, p:107–118, 1990.
120. SOILEAU L.C.; SILBERSTEIN L.; BLAU H.M.; THOMPSON W.J. Reinnervation of muscle fibre types in newborn rat soleus. **J Neurosci.** v. 7, p:4176-4194, 1987.
121. STARON, R.S., KRAEMER, W.J., HIKIDA, R.S., FRY, A.C., MURRAY, J.D., CAMPOS, G.E.R. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult fisher 344 rats. **Histochem. Cell.Biol.** v.111, p:117-123, 1999.
122. STOUT, A. L. WANG J., SANGER, J. M.; SANGER J. W, “Tracking changes in Z-band organization during myofibrillogenesis with FRET imaging,” **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.65, p:353–367, 2008.
123. TOSCANO, A.E.; MANHÃES CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition.** v.24(3), p:270-8, 2008.
124. STEARNS, A.D. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. **Bioscience.** v.39, p:436-445, 1989.
125. VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**v.18;3(7), 2002.
126. VOYTIK S.L., PRZYBORSKI M., BADYLAK S.F., KONIECZNY S.F. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. **Dev. Dyn.** v.198, p: 214–224, 1993.
127. WALTERS EH, STICKLAND NC, LOUGHNA PTThe expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. **J Muscle Res Cell Motil.** v.21(7), p:647-53, 2000.
128. WATABE, S. Myogenic regulatory factor. In: Johnston, I.A. **Muscle Development and Growth**, Academic Press, p:19-41, 2001.
129. WEEDS AG & LOWEY S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. **J Mol Biol** v.3, p:379-421, 1971.
130. WILLIAMS, B.A.; ORDAHL, C.P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. **Development**, v.120, n.4, p.785-796, 1994.
131. WILSON S. J., J. J. ROSS, AND A. J. HARRIS. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development** v.102, p:815–821, 1988.
132. WITZEMANN, V. Development of the neuromuscular junction. **Cell Tissue Res.** v.326, p:263-271, 2006.
133. WOLFE RR. Skeletal muscle protein metabolism and resistance exercise. **J Nutr** v.136, p:525S-528S, 2006.

134. WOLFSON, L.; JUDGE, J.; WHIPPLE, R.; KING, M. Strength is a major factor in balance, gait, and the occurrence of falls. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**; v.50, p:64-67,1995.
135. WOOD S, SLATER C. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast and slow-twitch muscles. **J Physiol (Lond)**;500, p:165–176, 1997.
136. WOOD SJ, SLATER CR. Safety factor at the neuromuscular junction. **Prog Neurobiol**; v. 64, p:393– 429, 2001.
137. WORDEN, M.K. Modulation of vertebrate and invertebrate neuromuscular junctions. **Curr Opin Neur** 1998,v.8, p:740-745.
138. AMMIT PS, RELAIX F, NAGATA Y, RUIZ AP, COLLINS CA, PARTRIDGE TA, ET AL. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci** v. 119, p:1824-32,2006.
139. ZANDI-NEJAD K, LUYCKX VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. **Hypertension**,v.47, p:502-508, 2006.
140. ZAR, J.H (2009). Biostatistical analysis, 5th ed, Prentice-Hall, New Jersey, 944.
- ZHENG S, ROLLET M, PAN YX. Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP β) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle. **Epigenetics**.v;6(2), p:161-70, 2011.
141. ZHU, M. J., S. P. FORD, P. W. NATHANIELSZ, P.W.; DU, M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. **Biol. Reprod.** v.71, p:1968-1973, 2004.
142. ZHU, M.J; FORD, S.P.; WARRIE, J.; MEANS, W.J.; HESS, B.W.; NATHANIELSZAND, P.W.; DU, M. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J Physiol**, v.15; p: 241–250, 2006.

8- CAPÍTULO I

Artigo: Maternal undernutrition changes the neuromuscular junctions (NMJs) and promote catch-up growth in offspring submitted to protein restriction during all pregnancy. L.C. Cabeço, P.A.T Souza, E.P. Castan, P.A. Boer, S.M.M Matheus , M. Dal Pai Silva - (Artigo será submetido a Revista *Journal Histology and Histopatology*)

9- CAPÍTULO II

Artigo: Protein restriction during pregnancy induced muscle fiber changes without alter MyoD and Myogenin gene expression in offspring. L.C. Cabeço, P.E. Budri , M. Baroni, E. P. Castan , F.R. Carani, P.A.T Souza, P.A. Boer, S.M.M Matheus, M. Dal Pai Silva - (Artigo será submetido a Revista *Journal Molecular Histology*)

Maternal undernutrition changes the neuromuscular junctions (NMJs) and promote catch-up growth in offspring submitted to protein restriction during all pregnancy.

L.C. Cabeço¹, P.A.T Souza¹, E.P. Castan¹, P.A. Boer¹, S.M.M Matheus², M. Dal Pai Silva¹.

Ludimila Canuto Cabeço

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.
luzdimila_bio@yahoo.com.br

Paula Aiello Tomé de Souza

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.
pats_souza@yahoo.com.br

Eduardo Paulino Castan

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.
eduardo_castan@yahoo.com.br

Patrícia Aline Boer

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.
boer@ibb.unesp.br

Selma Maria Michelin Matheus

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Anatomy, Botucatu, São Paulo, Brazil.
micmath@ibb.unesp.br

Maeli Dal Pai Silva: corresponding author

UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil, Phone/Fax: +55 (14) 3811-6264. dpsilva@ibb.unesp.br

Keywords: acetylcholine receptor; junctional folds, morphology; gene expression; fetal programming.

ABSTRACT

Stimulus during the pregnancy, such as protein restriction, can affect morphophysiological parameters in offspring with consequences in adulthood. Protein restriction during gestational period can alter the skeletal muscle phenotype in offspring, but we not find if this condition can also affect the neuromuscular junction (NMJs) since the skeletal muscle phenotype maintenance depends on the functional integrity of the NMJs. The aim of this study was to evaluate NMJs morphology and α , γ and ϵ nAChRs subunits gene expression in the soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles in male

offspring (30-days and 16-week-age) from dams fed with low protein diet (6% X 17% protein) during all gestational phase. Our results showed that at birth and with 30-days-old, the body weight of pups was statistically lower in LP compared to NP group; at 16-week-old, no significant difference were observed. At 30-days, the SOL muscle weight was lower in LP compared to NP group ($P < 0.05$) and no statistical difference was observed in the EDL muscle weight. At 16-week-old, the soleus muscle weight/body weight ratio was lower in LP group compared to NP group, $P < 0.05$. SOL NMJs in LP group presented a decreased in the synaptic folds and the post synaptic membrane presented a smooth aspect. In the terminal axons, myelin figures and endoplasmic reticulum dilated also were frequently observed. These changes were more evident in offspring with 30-days-old. Regarding gene expression of nAChRs subunits, only EDL muscle from offspring with 30-days-old showed decrease in α , γ and ϵ nAChRs subunits mRNA in LP comparing to NP groups, $P < 0.05$. In EDL muscle from offspring of LP group with 16-week-old, γ subunit nAChRs was decreased when compared with NP group, $P < 0.05$. Our work showed that low-protein diet imposed during all pregnancy change the gene expression of nAChR in EDL muscle and promoted alterations in SOL NMJs in offspring with 30 days old, and induced catch-up growth in adulthood offspring fed with diet content 23% protein from birth until 16-week-old.

INTRODUCTION

Animal research has increasingly emphasize the importance of nutritional manipulation in gestacional phase on skeletal muscle development (Fahey et al., 2005; Zhu at al., 2006, Mallinson et al., 2007, Toscano et al., 2008). This tissue presents a metabolic and structural diversity according to the functional demands (Campos et al., 2002) and has a high modulation capacity in response to several specific stimulus as exercise (Magaudda et al., 2004; Huber et al., 2009), immobilization (Jackson et al., 2010), diet (Huber et al., 2009) and malnutrition (Malisson et al., 2007; Toscano et al., 2009).

Stimulus in the pregnancy stage, such as protein restriction, can affect several morphophysiological parameters of offspring with consequences in adulthood (Langley-Evans, 2004). The mechanism involved with this phenomenon is known as “fetal programming,” where environmental aggression during a critical period of development would have permanent effects on the structure and function of the organs (Lucas, 1991; Gicquel, 2008). Protein restriction during pregnancy can change the skeletal muscle phenotype in offspring (Fahey et al., 2005; Zhu at al., 2006, Mallinson et al., 2007, Toscano et

al., 2008), however, we did not find if this condition can affect the neuromuscular junction (NMJs). Skeletal muscle phenotype maintenance also depends on the functional integrity of the NMJs.

During the embryonic myogenic process in mouse, that occur around 12-14 days, acetylcholine receptors (nAChRs) are pre-patterned at sites that are used by the growth of motor neurons to form synaptic contacts (Witzemann, 2006). Synaptic transmission begins within minutes after the growth cone contacts a myotube and is mediated initially by nAChRs expressed along the entire myotube surface (Mishina et al., 1986; Warltier, 2002). This stage embryonic, the acetylcholine receptors (nAChR) are a pentameric complex of five subunits formed for a molar stoichiometry of $\alpha 1(2)$, β , δ and γ . In postnatal and adult stage, the subunit γ is replaced for subunit ϵ and the nAChR are distributed in clusters (Charbonnier et al., 2003). After the formation of junctional folds, the adult nAChR are found in shoulders of each junctional fold (Martyn et al., 2009).

NMJs can modulate in many conditions, as age (Barker & IP, 1966; Andonian & Fahim, 1988; Fahim, 1997; Soares & Boaro, 1998; Koirala et al., 2003, Przybyla et al., 2006), compressions, crushing and traumatic peripheral nerve sections (Gattuso et al., 1988) degree of activity (Fahim & Robbins, 1986; Deschenes et al., 1993; Fahim, 1997) and congenital myasthenic syndrome (Brain et a, 2001); changes can be represented by size alterations (Andonian & Fahin, 1988; Waerhaug et al., 1992; Deschenes et al., 1993; Fahin, 1997), synaptic vesicles, nAChR dispersion (Desaulniers et al., 1998; Deschenes et al., 2000, Brain et a, 2001) and also by genic expression of nAChR subunits alterations (Witzemann et al., 1996; Brain et a, 2001). Thus, these changes in NMJ can compromise the functional capacity as muscle atrophy and fatigue, in turn, affecting the skeletal muscle tissue.

Recently, studies have demonstrated a link between fetal programming and many diseases in the long term, such as cardiovascular disease, hypertension, obesity and neurodegenerative diseases (Barlow et al., 2003; Fowden et al., 2006; Sinclair & Singh, 2007). Some of these diseases, as insulin resistance (type II diabetes) and Alzheimer's disease (Ozzane et al., 2003; Barlow et al., 2003; Jensen et al., 2007) are linked with the functional capacity of skeletal muscle. Although some studies showed the effect of fetal programming on skeletal muscle in rats (Huber et al., 2009; Malisson et al., 2007; Toscano et al., 2009), nothing is known about NMJs changes in this condition.

Therefore, the aim of this study was to evaluate NMJs morphology and α , γ and ϵ nAChRs subunits gene expression in the soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL)

muscles from male offspring (30-days and 16-week-age) of the dams fed with low protein diet (6% protein) during all gestational phase.

MATERIALS AND METHODS

Our experiment was performed in accordance to the Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol No. 081/07-CEEA). The animals had *ad libitum* access to food and water at all times and temperature-controlled conditions on a 12 h light–dark cycle.

Dam rats: Virgin female Wistar rats, body weight between 250 and 300g, were housed individually with males under standardized conditions. After mating, pregnancy was determined by examination of vaginal smears to detect the sperm. Sixteen pregnant rats were isolated and randomly divided into two experimental groups: a control dams group was fed with normal protein diet (17% protein) and other dams group was fed with isocaloric low protein diet (6,0% protein). The diets were administered from first day until the last pregnancy. The composition of the diets is shown in table 1. On the day of parturition (gestational day 21), dams had *ad libitum* access to standard rat chow Purina (23% protein), Labina, Brazil until weaning (Figure 1).

Offspring: at birth, the litter sizes were standardized to eight randomly chosen pups, being held four males and four females in each litter. The female pups were not used in the analysis, were maintained until weaning to maintain equal availability of food between offspring. After weaning, all male rats were fed *ad libitum* with standard rat chow (Purina, Labina, Brazil), containing (w/w) 57.5% starch, 23% protein, 2.5% lipid, 9% cellulose, 8% vitamins and salts, until 30-days-old and 16- weeks-old (Figure 1).

Analyzed groups: Four groups were studied, two groups with 30-days-age (NP and LP Group) and two with 16-weeks-age (NP and LP Group). NP Group (n=8): offspring born to dams fed with normal proteic diet (17% protein) during all pregnancy. LP Group (n=8): offspring born to dams fed with low protein diet (6% protein) during all pregnancy. The offspring were weighed at birth, with 30-days-old and with 16-week-old. The offspring with 30-days-old and with 16-week-old were euthanized (Figure 1).

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 2:1 solution of ketamine hydrochloride (Ketamine ®) 50mg/ml, and xylazine hydrochloride (Xylazine ®) 20mg/ml, respectively, at a dose of (0.1 ml/100g), were weighted the body weight and euthanized.

Extensor Digitorum Longus (EDL) and Soleus (SOL) muscles were collected, weighted and kept according with analyzes type.

Ultrastructural Analyzes of the neuromuscular junction (NMJ) and muscle fibers: The SOL (N=3) and EDL (N=3) muscles were removed including the motor region and preserved in Karnovsky fixative solution (2.0% glutaraldehyde and 4.0% paraformaldehyde 1:1 in Sodium Phosphate Buffer 0.1 M, pH 7.4). The SOL and EDL were processed in accordance with the routine for Transmission Electron Microscopy and photographed by a Philips CM100 FEI.

nAChRs subunits gene expression assessed by Real-Time PCR: Total RNA was extracted from muscle samples with TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), which is based on the guanidine thiocyanate method. Frozen muscles were mechanically homogenized in 1 mL of TRIzol reagent. Total RNA was resuspended in RNase-free water, treated with DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any possible DNA present in sample. Total RNA was quantified using Nanodrop spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), measuring optical density (OD) at 260nm. RNA purity was ensured when OD_{260/280} ratio was around 2.0. And RNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis, which well defined bands were observed correspondents to 18S and 28S ribosomal RNAs. For each sample, cDNA was synthesized from 2µg of total RNA using High Capacity cDNA archive kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Each reaction had 10µL of 10X Reverse Transcription Buffer, 4µL of 25X dNTPs, 10µL of 10X random primers, 100 units of RNase inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 250 units of Reverse Transcriptase MultiScribe™, and the final volume was adjusted to 200µL with nuclease-free water. And cDNA synthesis reaction conditions were: 10 minutes at 25°C for primers annealing and 2 hours at 37°C for reverse transcription. Reaction control was made by omission of the reverse transcriptase enzyme. All cDNA samples were amplified by PCR to ensure that there was no contamination by DNA. The resulting cDNA samples were aliquoted and stored at -20°C. 2µL of cDNA, corresponding to 20ng of total RNA, were used as template in real time PCR reactions which were made in 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with equipment universal thermal cycling conditions: 95°C for 10min, 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1min. The reactions were performed in duplicate using 0.4 µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with final volume of 25 µL.

Gene sequences were selected from the accession numbers in the National Center for Biotechnology Information database (Table 2). Primer sequences were designed using the primer design function of the software Primer Express v3.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Series of five dilutions (10x) was constituted from PCR products diluted 500 times, for each gene, from an initial mixture containing equal amounts of cDNA from all samples, thus were generated a five-point standard curve for each primer set initially chosen for qPCR. qPCR linearity and efficiency were calculated from those standard curves slope, generated by 7300 System SDS software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for each gene analyzed. The analysis of all standard curves showed high linearity ($r^2=0.99$). PCR efficiency (Ex) was calculated from the equation $Ex = 10^{-1/\text{slope}} - 1$. Slope of -3.32 implies in a reaction efficiency of 100%. All genes showed slope around -3.32 and estimates of efficiency were between 98.0% and 100.5%.

Gene expression was compared between individual samples using the $\Delta\Delta Cq$ method described by Livak & Schmittgen (2001). It was also necessary to perform the correction of experimental variability between different samples, for example, amount of RNA and reverse transcription reaction efficiency, prior to the final quantification. Data normalization for at least three reference genes is the most accepted method to avoid such disparities (Vandesompele et al., 2002). The choice of appropriate genes is crucial for reliable results, and the expression level of these genes must remain unchanged for different experimental conditions (Alway et al., 2002, Sanchez et al., 2006). Expression level of three genes, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) TATA box binding protein (TBP) and acidic ribosomal phosphoprotein (ARBP), actin beta (ACTB) was assessed through DataAssist software v 2.0 from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and used for normalization as reference genes. The software was also used for relative gene expression quantification.

Statistical analysis. The comparison between groups (NP and LP), for all parameters, were achieved using the Student t-test for independent sample (Zar, 2009). A p value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant. The results were expressed as mean \pm standard deviation for all parameters.

RESULTS

Offspring's body weight

At birth, the body weight of pups was statistically ($p < 0,05$) lower in LP compared to NP group; body weight of LP group, with 30-days-old, was lower than NP group. At 16-week-old, no significant difference in body weight was observed in LP compared to NP group (Figure 2).

The muscle weight and muscle weight/body weight ratio from 30-days and 16-week-old offspring are shown in the Figure 3. At 30-days, the SOL muscle weight (g) was lower in LP compared to NP group and no statistical difference was observed in the EDL muscle weight. There were no significant differences in the SOL and EDL muscles weight/body weight ratio between the experimental groups in this period. At 16-week-old offspring there were no significant differences in the SOL and EDL muscles weight between the experimental groups. However, the SOL muscle weight/body weight ratio was lower in LP group compared to NP group; no statistical difference was observed in the EDL muscle weight/body weight ratio between the experimental groups (Figure 3).

Ultra-structural analyzes

At 30-days and at 16 week-old, ultrastructural analyzes of SOL and EDL muscle from both groups studied showed fibers with normal morphology; this included sarcoplasm presenting myofibrils with well defined sarcomeres that presented A and H bands and Z line. Mitochondrias and lipids droplets were observed among the myofibrills, more proeminent in SOL muscle (Figures 4B and 5B).

Ultrastructural analysis of the SOL and EDL NMJs from NP group showed expanded terminal axons in shallow or superficial synaptic gutters. The terminal axons presented numerous synaptic vesicles, some multivesicular bodies and mitochondrias were also found interspersed among the synaptic vesicles. Synaptic folds were observed between the terminal axons and the muscle fiber. At the presynaptic membrane we could visualize some dense spots (active zones) on the inner surface. On the top of the junctional folds, in the postsynaptic region, dense points also were observed, which corresponds to the nAChR regions (Figures 6D and 7B).

Considering the SOL NMJs in LP group, changes were observed in postsynaptic region; there were a decreased in the synaptic folds and the post synaptic membrane presented a

smooth aspect. In the terminal axons, myelin figures and endoplasmic reticulum dilated also were frequently observed (Figures 6E and 6F). These changes were more evident in offspring with 30-days-old (Figures 6C, 6E and 6F). No changes were observed in EDL NMJs in offspring of LP with 30-days-old and 16-week-old groups (Figures 6D and 7D).

nAChRs subunits gene expression assessed by Real-Time PCR

EDL muscle from offspring with 30-days-old showed decrease in α , γ and ϵ nAChRs subunits mRNA in LP comparing to NP groups; SOL muscle did not show changes in mRNA expression of nAChRs subunits. In EDL muscle from offspring of LP group with 16-week-old, gamma subunit was decreased when compared with NP group, $p < 0.05$. In SOL muscle, no change was observed in the subunits gene expression in this age (Table 4).

In the scheme of figure 8 was showed the changes observed only in animals with 30 days of age.

DISCUSSION

In this study, we showed that protein-restriction during pregnancy induced decrease in the body weight at birth and at 30 days; decrease in SOL weight; decrease in gene expression of nAChRs subunits in EDL muscle at 30 days and promoted ultrastructural changes of the SOL NMJs in offspring.

Some studies in rats, lambs and pigs whose fetuses were exposed to the protein and/or energy restriction during pregnancy have shown a decrease in body weight at birth (Dwyer et al., 1994; Desai & Ross, 2007, Chen et al., 2009, Fahey et al., 2005). According with the hypothesis of fetal origin in humans, there is a correlation between low birth weight, rapid weight gain during the childhood and the potential risk of disease in adulthood (Barker et al., 2002, Gohlke, 2011).

However, experimental studies in rats involving maternal food restriction have shown conflicting results on body weight in adulthood animals (Toscano et al., 2008; Desai & Ross, 2007, Chen et al., 2009). The results demonstrate that the effects of malnutrition in the long term depend of the dietary pattern (high or low calorie/protein) that this offspring were fed after birth and post weaning (Desai & Ross, 2007; Matsakas & Patel, 2009). In our work, adulthood offspring (16- weeks- old) showed catch-up growth.

Our results were similar to that presented by Chen et al., (2009) and Bhasin et al. (2009). The authors showed that a protein restriction (9%) during pregnancy caused a reduction in the body weight at birth being recovery seventh day post birth when these offspring were fed by dams not undernourished during pregnancy. In our experiment, the offspring with 30-day-old showed body weight reduction and with 16-week-old, the body weight was similar to the LP group. The difference in the body weight recovery showed in our study can be explained by the dietary patterns used. The treated dams were fed protein-restricted only during pregnancy (6% versus 17% protein diet) being fed with standard diet (23% protein) during lactating phase. When the offspring were separated, in the post weaning, also received the standard diet containing 23% protein. We believe that protein content offered to LP group in posnatal was enough to body weight recovery during growth. However, Toscano et al., 2008 has shown that maternal protein restriction (6% versus 17% protein diet) in rats decreased the body weight of offspring also in adulthood. However, these offspring were fed until 60 days of age with a diet containing 17% protein and following up 90 days of age with a diet containing 12% protein. It is possible that this protocol, with a low amount of protein in comparison to our study (23% of protein) promoted the maintenance of the body weight decreased at birh until adulthood. In our experiment, the results showed that there was catch-up growth in the offspring that received the standard diet containing 23% protein in post weaning.

We observed a reduction in the SOL muscle weight in LP group with 30-days-old and reduction in the SOL muscle weight/body ratio in LP group with 16-week-old; this fact did not occurred in EDL muscle. Toscano et al. (2008) observed a reduction in the SOL and EDL muscles weight in rats with at 25 and 90 day age in response to maternal protein-restricted. As the protein content offered to the offspring during lactating phase and pos weaning was different that used in the present study, it is possible that the diet given after birth has been enough to maintenance the normal EDL weight and not enough to recovery the SOL weight. SOL muscle present an oxidative metabolism and slow contraction being used for sustained activities (Baldwin & Tipton, 1972). We think that the difference observed in relation to the weight muscle could be related to a higher protein turnover in SOL when compared with EDL muscle (Garlick et al., 1984).

There are no studies that evaluated the effect of protein restriction during pregnancy on the NMJs morphology in offspring. In the present work, although we did not observe ultrastructural changes in SOL and EDL muscle fiber, in both age analyzed, the SOL NMJs

from LP offspring with 30-days-old showed some alterations. There were observed a decreased in synaptic folds and the postsynaptic membrane presented a smooth aspect; myelin figures and dilated sarcoplasmic reticulum were also observed.

Changes in NMJs morphology can occur in many conditions, as compressions, crushing and traumatic peripheral nerve sections (Gattuso et al., 1988), age (Barker & IP, 1966; Andonian & Fahim, 1988; Fahim, 1997; Soares & Boaro, 1998; Koirala et al., 2003, Przybyla et al., 2006), degree of activity (Fahim & Robbins, 1986; Deschenes et al., 1993; Fahim, 1997) and congenital myasthenic syndrome (Brain et al., 2001).

The changes pattern observed SOL NMJs in LP offspring with 30-days-old was similar to the morphological changes described in mice diaphragms muscle, postnatal day 20, which was deficient in ϵ -subunits of the nAChR gene expression (Schwarz et al., 2000).

Gene expression of the nAChR did not change in SOL muscle; for EDL muscle, there were a decrease in mRNA expression of α , γ and ϵ nAChR subunits in LP offspring with 30-days-old. Comparing the morphological findings with gene expression of nAChR subunits, we could infer that there is no correlation between gene expression of nAChR subunits and changes in junctional folds observed in SOL muscle; the nAChR are distributed almost exclusively in the apex region of the fold (Martyn et al., 2009). Ultrastructural studies show nAChR region as dense point (Engel, 2003), fact also observed in our study.

The changes in junctional folds in SOL muscle, represented by smooth aspect could lead in the reduction of voltage-gated sodium channels, which are distributed in the troughs of the folds (Wood & Slater, 1997; Hughes et al., 2006), that in turn, could take less action potential to muscle. The failed in muscle action potential may contribute to promote the maintenance of a decreased SOL weight muscle in offspring in response to protein restriction maternal from birth to 30-days. However, studies need to be conducted to confirm this hypothesis.

The postsynaptic folds are develop 6-9 days postnatal (Lomo, 2003; Witzemann, 2006) and the density of sodium channels in the plasma membrane seems to rise after 8 postnatal days (Mänttari et al., 2005). In our study, 6-9 days postnatal, the pups of dams treated with low protein (6%) during gestational phase, was normally fed, since mothers received the standard diet after the birth of pups. This fact may be due the interference of epigenetic factors during gestational development (Feinberg, 2007) that could affect the protein expression related to the maintenance of NMJs structure and function. This could explain our findings in SOL muscle from offspring LP, with 30-days-old.

There is now proof of principle that maternal diet can have a profound impact on the epigenome and so determine gene expression patterns throughout the life-course (Gohlke, 2011). The changes that represent these impacts include DNA methylation and post-translational modification of the histones around which DNA is wrapped when packaged in the nucleus. Importantly, these marks are malleable in response to environmental exposures and contribute to phenotypic plasticity in the context of a fixed genotype (Mathers & MacKay, 2009). However, as there are no epigenetic studies involving the NMJs and programming fetal architecture, more studies are needed to better understanding in this matter.

In our experiment, EDL muscle LP group with 30-days-old showed reduced in transcript levels for all nAChR subunits analyzed (α , ϵ and γ) compared to the NP group. Although EDL muscle did not show changes in NMJs, we observed an increase in IIB fiber frequency (data not shown), as also observed by Toscano et al., 2008. This muscle fiber modulation that occurred during maternal undernutrition could explain our results. At 16-week-old, there are no change in the transcript levels for the α and ϵ nAChR subunits in LP compared to the NP groups; the transcript level for the γ nAChR subunit decreased in LP compared to the NP groups. This subunit is more expressed during the embryonic stage and is replaced by the epsilon subunit at 12-days-old in rats (Adams et al., 1995; Charbonnier et al., 2003). The results obtained for NMJs in EDL muscle indicate that the animal recovered the effects of maternal protein restriction, since the weight was also recovered in this process, showing a catch-up growth.

In conclusion, our work showed that low-protein diet (6% versus 17%) imposed during all pregnancy change gene expression of nAChR in EDL muscle, promoted alterations in NMJs in SOL muscle in offspring with 30 days old and induced catch-up growth in adult offspring fed with diet content 23% protein from birth until 16-week-old.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Research foundations of the state São Paulo (FAPESP), process number 2007/59970-8.

TABLES

Table 1. Composition of the experimental diets.

<i>Ingredient (g/Kg)</i>	Normal-protein diet (17% protein)	<i>Low-protein diet (6% protein)</i>
Cornstarch	397	480
Dextrin	130.5	159
Saccharose	100	121
L-Cystine	3	1
Fiber	50	50
Soybean oil	70	70
Mineral mix AIN93G†	35	35
Vitamin mix AIN93G*	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5

† American Institute of Nutrition 93; mineral mix provided (mg/kg diet): calcium 5.0, phosphorus 1.6, sodium 1.0, potassium 2.3, magnesium 0.5, iron 0.03, zinc 0.03, and copper 0.01. * American Institute of Nutrition 93G; vitamin mix provided (mg/kg diet): nicotinic acid 30.0, calcium pantothenate 16.0, pyridoxine- HCl 7.0, thiamin-HCl 6.0, riboflavin 6.0, folic acid 2.0, biotin 2.0, cyanocobalamin, 25.0, _-tocopherol 150.0, retinyl palmitate 8.0, cholecalciferol 2.5, and phylloquinone 0.75. (Reeves, 1993).

Table 2. Primers used for Real-Time PCR amplification of reverse transcribed RNA Product.

Product	Accession no	Sequence (50–30)
GAMMA 1 (γ)	X06364	F: AACGCAAGCCCCTCTTCTAT R: GAGGATCGCAACTGAGGAGA
ALPHA 1 (α)	NM_024485	F: TCCCTTCGATGAGCAGAACT R: AGCCGTCATAGGTCCAAGTG
EPSILON 1 (ϵ)	NM_017194	F: GGCTCAACTTCAGCAAGGAC R: AGCCATACATGTTTCGGAAGG
ARBP*	NM_022402	F: CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG R: AACAGTCGGGTAGCCAATCTG
TBP*	NM_001004198	F: GCCACGAACAACACTGCGTTGAT R: AGCCCAGCTTCTGCACAACCTCT A
GAPDH*	AB017801.1	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTC
HPRT*	NM_000194.1	F: TGACACTGGCAAAACAATGCA R: GGTCCTTTTCCACCAGCAAGCT
ACTB*	NM_031144	F: CAGGTCATCACTATCGGCAATG R: TTTCATGGATGCCACAGGATTC

Accession No, GenBank accession number. F: primer senso; R: primer anti-senso. GAPDH: Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase, TBP: TATA binding box protein, ARBP: Acidic ribossomal phosphoprotein, HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase, ACTB: Actin beta. * housekeeping.

Table 3. Gene Expression of nAChRs assessed by Real-Time PCR

	Groups with 30-days-old		Group with 16-week-old	
	NP Group (n=8)	LP Group (n=8)	NP(n=8) Group	LP Group (n=8)
SOL Muscle				
<i>α subunit</i>	0.304 ± 0.117	0.338 ± 0.287	1.158 ± 0.554	1.072 ± 0.241
<i>γ subunit</i>	0.309 ± 0.215	0.276 ± 0.204	0.438 ± 0.209	0.587 ± 0.227
<i>ε subunit</i>	0.355 ± 0.177	0.384 ± 0.295	0.652 ± 0.345	0.781 ± 0.229
EDL Muscle				
<i>α subunit</i>	0.779 ± 0.116	0.675 ± 0.091*	0.622 ± 0.225	0.765 ± 0.225
<i>γ subunit</i>	0.750 ± 0.176	0.604 ± 0.086*	1.920 ± 1.245	0.965 ± 0.358*
<i>ε subunit</i>	1.040 ± 0.080	0.861 ± 0.128**	2.997 ± 0.799	2.449 ± 0.985

Values arbitrary of gene expression of nAChRs assessed by Real-Time PCR are means ± SD. Soleus muscle (SOL) and extensor digitorum longus muscle (EDL). "n", refers to the number of the animals for group Values that are significantly different from the control group (NP) are denoted by an asterisk (*). *p<0.03 and **p=0.002, by Student t-test for independent sample (Zar, 2009).

FIGURES

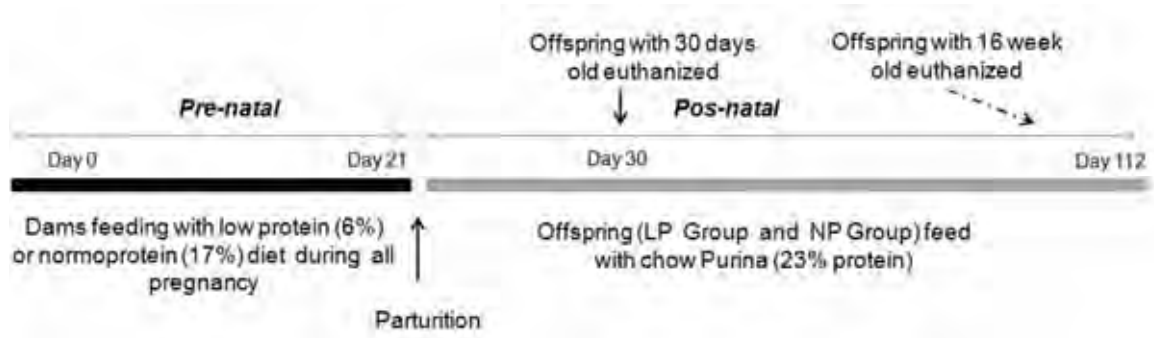


Fig.1. Scheme demonstrate the experimental design.

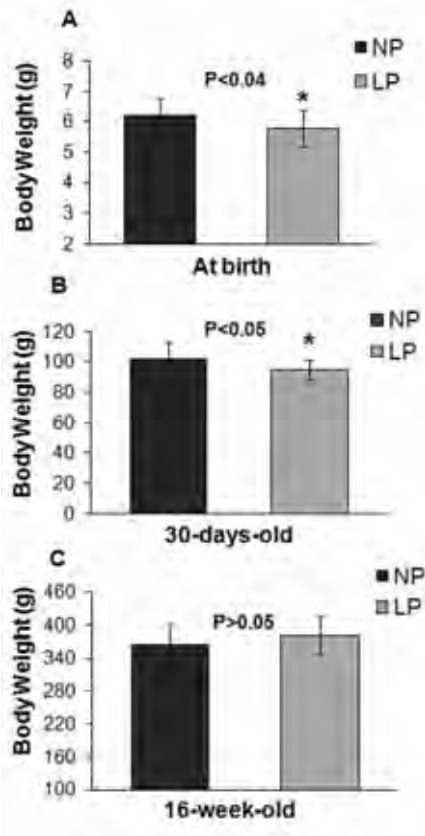


Fig.2. Body weight (g) from NP and LP groups in difference ages. A: at birth, B: 30-days-old and C: 16-week-old. Values expressed as mean ± SD, significant difference for p<0.05.

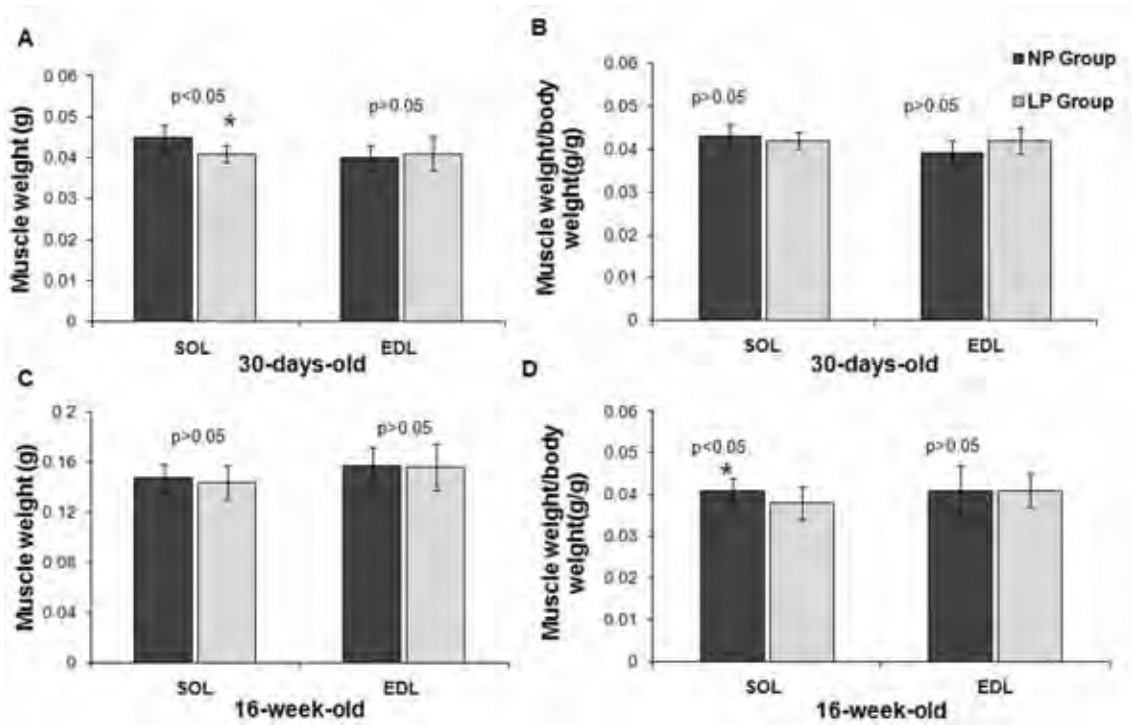


Fig.3. Muscle parameters of the offspring with 30-days-old (A-B) and 16-week-old (C-D). Values expressed as mean \pm SD, significant difference for $p < 0.05$.

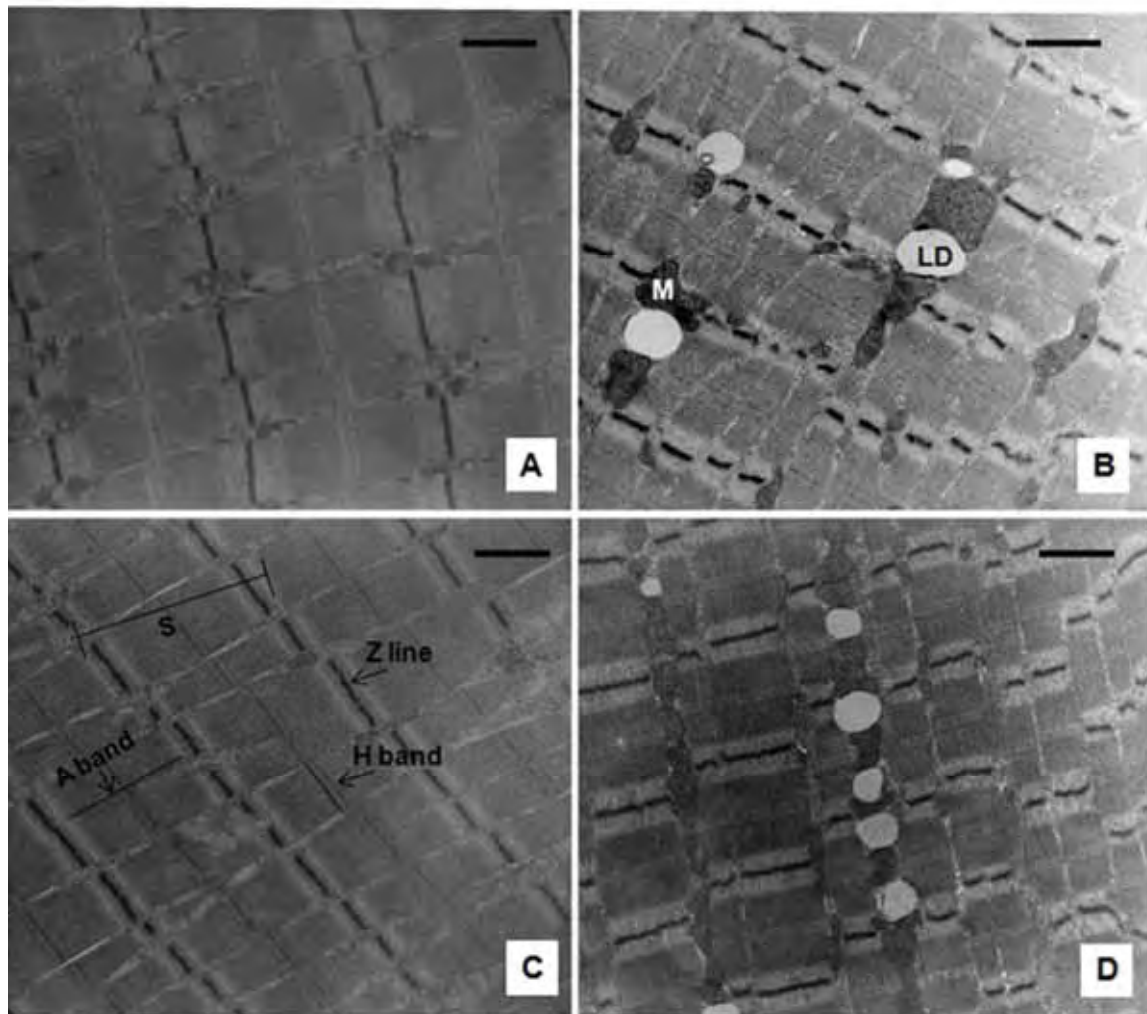


Fig.4. Electron micrograph of EDL (A-B) and SOL (C-D) muscle fibers from offspring with 30-days-old. A and C: NP Group; B and D: LP Group. LD: lipid droplets, M: intermyofibrillar mitochondria, S: sarcomeres. Arrows indicate H and A bands and Z line. The scale bars A: 0.75 μm ; B: 0.75 μm ; C: 0.8 μm and D: 0.8 μm .

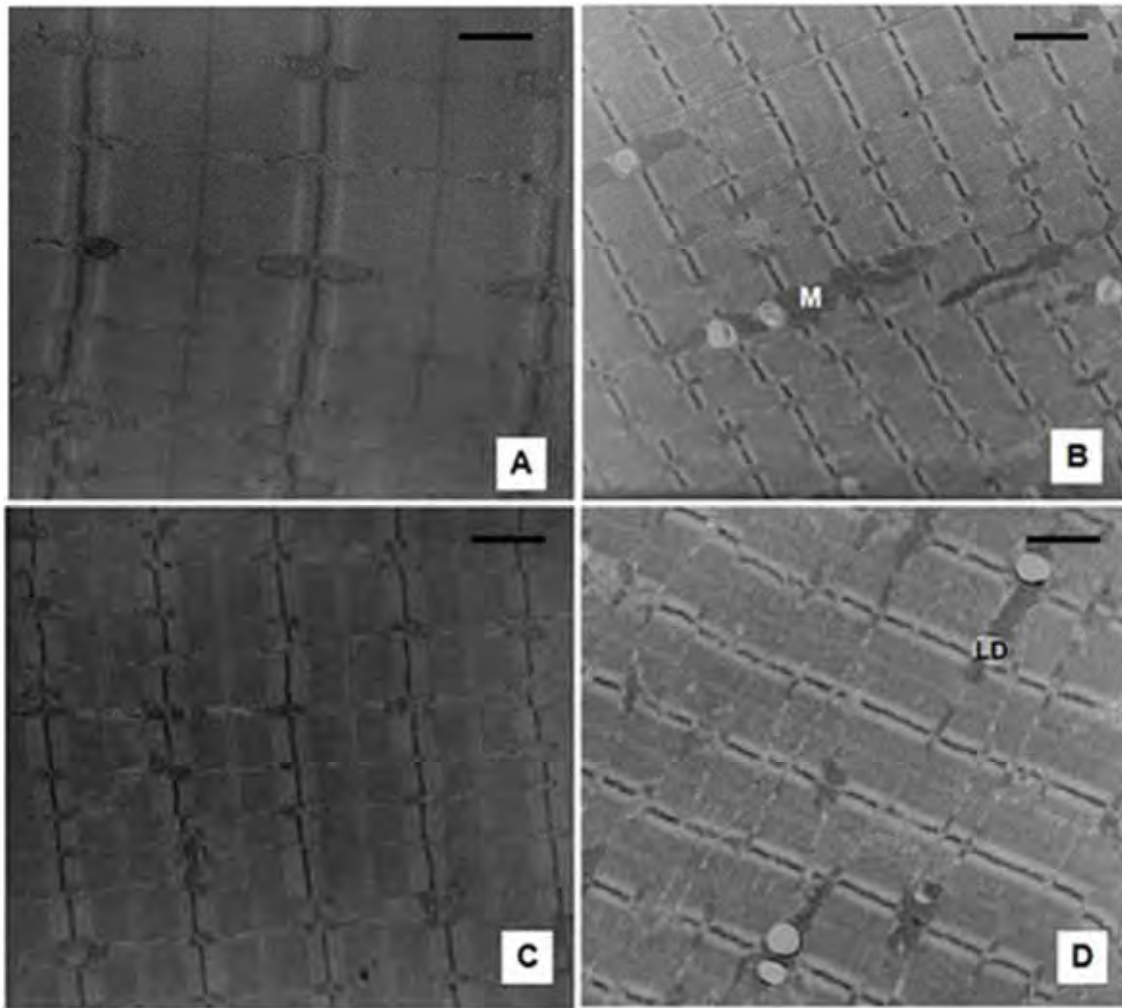


Fig.5. Electron micrograph of EDL (A-B) and SOL (C-D) muscle fibers from offspring with 16-week-old. A and C: NP Group; B and D: LP Group. LD: lipid droplets, M: intermyofibrillar mitochondria. S: sarcomeres. Arrows indicate H and A bands and Z line. The scale bars A: 0.31 μm ; B: 0.8 μm ; C: 1.29 μm and D: 1.02 μm .

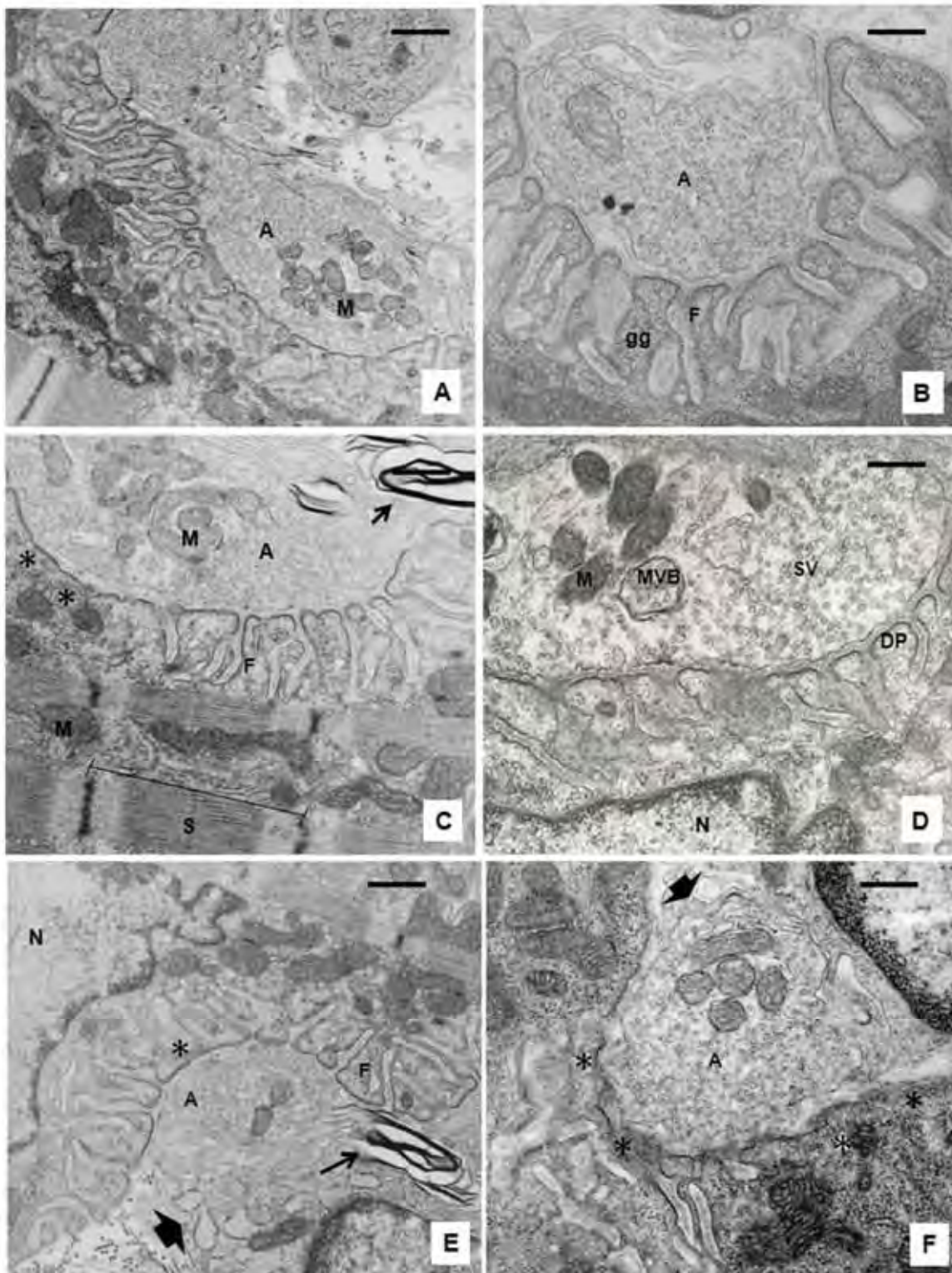


Fig.6. Electron micrograph of the Soleus (SOL) motor endplate. Figure A and B represents NP offspring with 30-days-old and 16-week-old, respectively; the figure C and D represents LP offspring with 30-days-old and 16-week-old, respectively; figure E and F also represents LP offspring with 30-days-old. A: axonal terminal associated with muscle fiber; N: myonuclei; M: mitochondria; S: sarcomere; SV: synaptic vesicles; F: junctional folds; gg: glycogen granules; MVB: multivesicular body; asterisk indicate reduced junctional folds and arrows indicate myelin figure. The thick arrow indicate

endoplasmic reticulum dilated. The scale bars A: 0.43 μm ; B: 0.23 μm ; C: 0.23 μm ; D: 0.23; E: 43 μm and F: 23 μm .

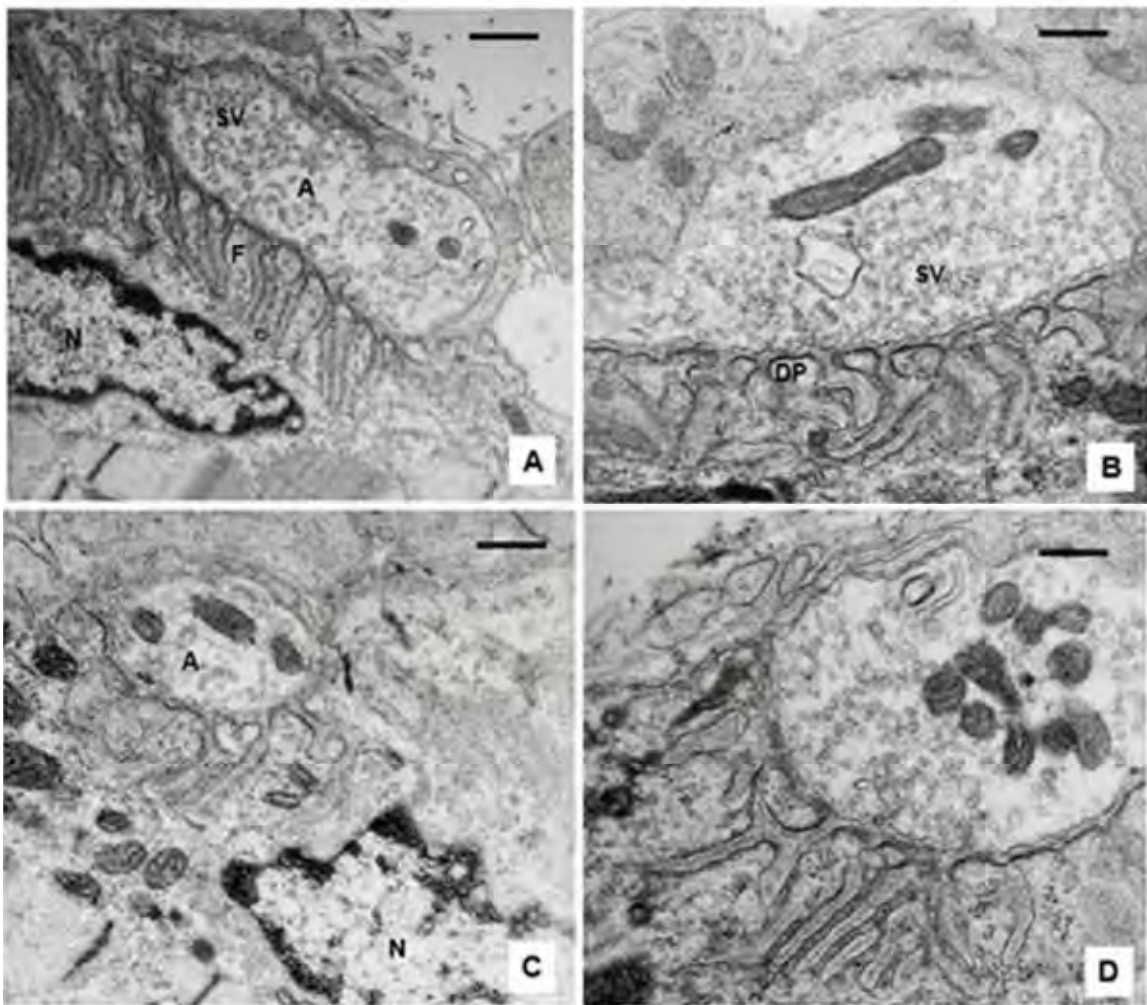


Fig.7. Electron micrograph of Extensor digitorum longus (EDL) motor endplate. Figure A and B represents NP offspring with 30-days-old and 16-week-old, respectively; the figure C and D represents LP offspring with 30-days-old and 16-week-old, respectively. A: axonal terminal associated with muscle fiber; N: myonuclei; M: mitochondria; F: junctional fold; DP: dense points; SV: synaptic vesicles. The scale bars A: 0.58 μm , B: 0.23; C: 0.43 μm and D: 0.23 μm .

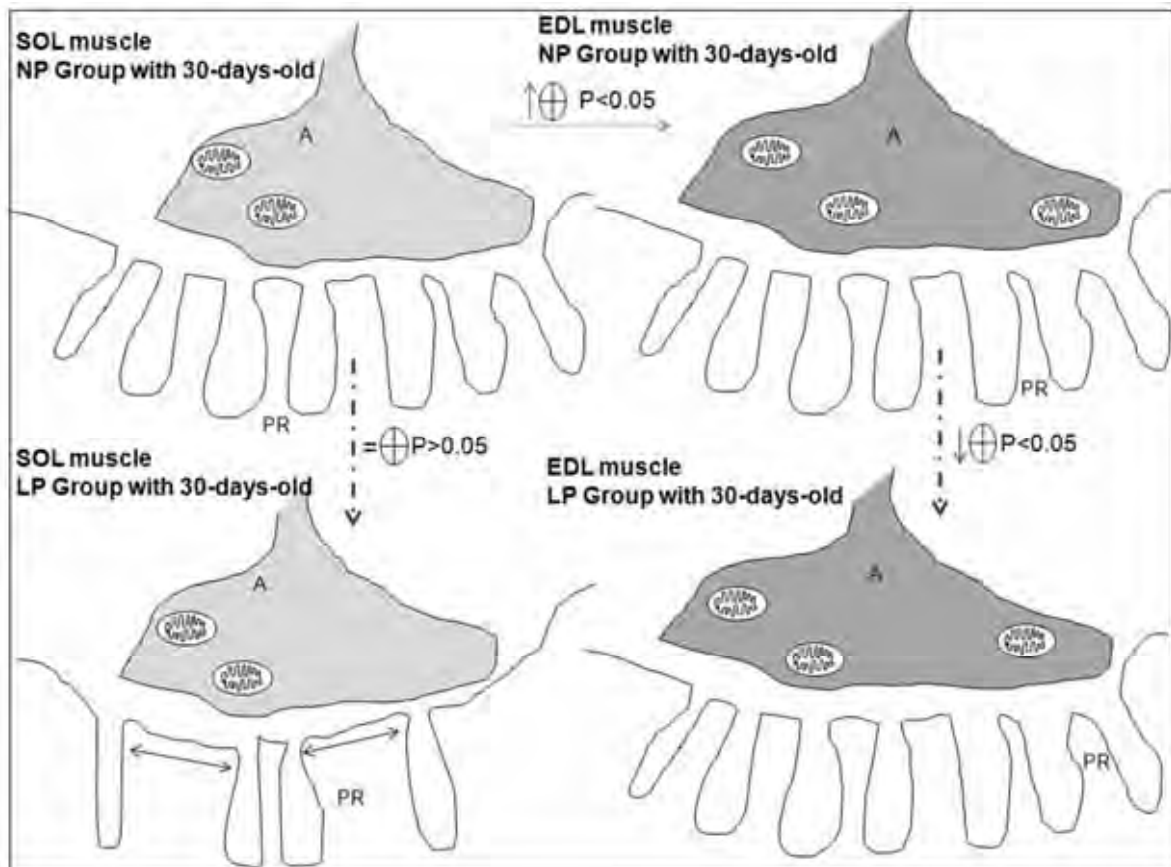


Fig.8. Scheme of the results. The θ symbol represented genic expression (RNAm) for subunits of acetylcholine receptor. Dashed arrow represents the comparison between groups, continuous arrow represents the comparison between skeletal muscles, two-dimensional arrow represented reduction of junctional folds. A: axonal terminal; PR: postsynaptic region.

REFERENCES

1. Banks GB., Fuhrer C, Adams ME, Froehner S.C (2003). The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: Requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. *Journal of Neurocytology*,709-726.
2. Barlow BK; Richfield EK; Cory-Slechta DA; Thiruchelvam M (2003). A Fetal Risk Factor for Parkinson's Disease. *Dev Neurosci.* 26,11–23.
3. Bayol S., Jones D., Goldspink G., Stickland N. C (2004). The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr.* 91,331–339.

4. Bhasin, K K S, Nas, A V, Martin L J, Davis R C, Devaskar S U, Lusia A (2009). Maternal Low-Protein Diet or Hypercholesterolemia Reduces Circulating Essential Amino Acids and Leads to Intrauterine Growth Restriction. *Diabetes*. 58,559-566.
5. Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002). Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*. 88,50–60.
6. Charbonnier, F., Della Gaspara, B., Armand, A.S., Lécolle, S., Launay, T., Gallien, C.L., Chanoine, C (2003). Specific Activation of the Acetylcholine Receptor Subunit Genes by Myod Family proteins. *J Biol Chem*. 278(35), 33169-33174.
7. Chen J-H, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne SE (2009). Maternal Protein restriction Affects Postnatal Growth and the Expression of Key Proteins Involved in Lifespan Regulation in mice. *Plos One*. 4(3),4950.
8. Daniels MP (1997). Intercellular communication that mediates formation of the neuromuscular junction. *Mol Neurobiol*. 14(3), 143-170.
9. Desai, M, Babu, J. Ross, M (2007). Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293, R2306–R2314.
10. Dwyer, C. M., N. C. Stickland, and J. M. Fletcher. 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J. Anim. Sci.* 72: 911-917.
11. Dobbins GC, Zhang B, Xiong WC, Mei L (2006). The Role of the Cytoskeleton in Neuromuscular Junction Formation. *J Mol Neurosci*. 30, 115-117.
12. Fahey, A.J.; Brameld, J.M.; Parr, T.; Buttery, P.J (2005). The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J. Anim. Sci.* 83, 2564-2571.
13. Feinberg AP (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 447,433-440.
14. Fowden, A.L.; Giussani, D.A.; Forhead, A.J (2006). Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. *Physiol*. 21, 29-37.

15. Gicquel, C., El-Osta, A. & Le Bouc, Y., 2008. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism.* 22(1), 1-16.
16. Glore S.R.; Layman D.K (1985). Loss of tissues in female rats subjected to food restriction during lactation or during both gestation and lactation. *J. Nutr.* 115, 233-242.
17. Gohlke, JM (2011). Developmental Programming and the Epigenome. *Encyclopedia of Environmental Health.* 51-59.
18. Huber, K., Mile J. L., Norman, A.M., Thompson, N.M., Davison, M., Breier, B.H (2009). Prenatally Induced Changes in Muscle Structure and Metabolic Function Facilitate Exercise-Induced Obesity Prevention *Endocrinology.* 150(9),4135–4144.
19. Langley-Evans, S.C. (2004) Fetal programming of adult disease: an overview. In: *Fetal Nutrition and Adult Disease Programming of Chronic Disease Through Fetal Exposure to Undernutrition* (ed. SC Langley-Evans), pp 1–20. CABI: Wallingford, UK.
20. Lucas, A (1991). Programming in early nutrition in man. *Ciba Foun Symp.* 156, 38-53.
21. Magaúda, L.; Mauro, D.D.; Trimarchi, F.; Anastasi, G (2004). Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl myol.* 14(1):17-21.
22. Mallinson, J.E.; Sculley, D.V.; Craigon, J.; Plant, R.; Langley-Evans, S.C.; Brameld, J.M. (2007). Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br J Nutri.*98, 292–299.
23. Martyn, J.J., Fagerlund, M.J. & Eriksson, L.I., (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia.* 64 ,1-9.
24. Mathers, J.C., Mckay, J.A. (2009) Epigenetics - potential contribution to fetal programming. *Adv Exp Med Biol.* 646, 119-23.
25. Matsakas A, Patel, K (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli *Histol Histopathol.*24, 611-629.

26. Mishina, M., T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Methfessel, and B. Sakmann (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*. 321, 406-411.
27. Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL (2003). Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol*. 177, 235-41.
28. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nut.*123, 1939-51.
29. Staron, R.S., Kraemer, W.J., Hikida, R.S., Fry, A.C., Murray, J.D., Campos, G.E.R (1999). Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult fisher 344 rats. *Histochem. Cell.Biol.* 111, 117-123.
30. Toscano, A.E.; Manhães Castro, R.; Canon, F (2008). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*. 24(3), 270-8.
31. Witzemann, V (2006). Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res*. 326, 263-271.
32. Zar, J.H (2009). *Biostatistical analysis*, 5th ed, Prentice-Hall, New Jersey, 944.
33. Zhu, M.J; Ford, S.P.; Warrie, J.; Means, W.J.; Hess, B.W.; Nathanielszand, P.W.; DU, M (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J Physiol*. 15; 241–250.

Protein restriction during pregnancy induced muscle fiber changes without alter MyoD and Myogenin gene expression in offspring

L.C. Cabeço, P.E. Budri, M. Baroni, E. P. Castan, F.R. Carani, P.A.T Souza, P.A. Boer, S.M.M Matheus, M. Dal Pai Silva.

Ludimila Canuto Cabeço

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. luzdimila_bio@yahoo.com.br

Paulo Eduardo Budri

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. luzdimila_bio@yahoo.com.br

Mirella Baroni

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. luzdimila_bio@yahoo.com.br

Eduardo Paulino Castan

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. eduardo_castan@yahoo.com.br

Fernanda Regina Carani

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. fcarani@gmail.com.br

Paula Aiello Tomé de Souza

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. pats_souza@yahoo.com.br

Patrícia Aline Boer

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil. boer@ibb.unesp.br

Selma Maria Michelin Matheus

UNESP, Institute of Biosciences, Department of Anatomy, Botucatu, São Paulo, Brazil. micmath@ibb.unesp.br

Maeli Dal Pai Silva: corresponding author

UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil, Phone/Fax: +55 (14) 3811-6264. dpsilva@ibb.unesp.br

Keywords: skeletal muscle; maternal protein restriction; pregnancy; fetal programming; myogenic regulatory factors.

ABSTRACT

Variation in nutrient supply throughout maternal gestation on fetal development, in special, the protein restriction can affect various morphophysiological parameters in offspring with consequences in adulthood. This phenomenon, known as induced phenotypic traits (fetal programming), can cause changes in skeletal muscle phenotype in the short and long term. In this study, we investigated and compared muscle fiber type changes and gene expression in offspring from dams submitted to protein restriction during pregnancy in Soleus (SOL—oxidative and slow twitching muscle) and in Extensor Digitorum Longus (EDL—glycolytic and fast twitching muscle). Offspring rats, with 30-days-age and 16-weeks-age, from dams fed with hipoproteic diet (6% protein, LP, $n=8$), and normoproteic diet (17% protein, NP, $n=8$) were euthanized and SOL and EDL muscles were removed and frozen in liquid nitrogen. Histological sections (8 μ m) were submitted to the myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry reaction for muscle fiber types frequency (%) and the cross sectional area (CSA) analysis. Gene and protein expression of MyoD and Myogenin were determined by RT-qPCR and Western Blot, respectively. Our results showed an increasing in IIB and a decreased in I and IIA+IID fiber frequency in EDL muscle and no difference in muscle fiber frequency was observed in SOL muscle, in LP group with 30-days-old. At 16-weeks-old, there were no change in muscle fiber types frequency in SOL and EDL muscles. In LP group, muscle fiber type I CSA decreased only in SOL muscle in all periods studied. MyoD and Myogenin expression analyses were similar between all groups. Our results showed that maternal protein restriction induced muscle morphological changes more prominent in SOL (oxidative and slow twitching muscle) and did not alter MyoD and Myogenin expression.

INTRODUCTION

Skeletal muscle is a highly plastic tissue that adapts to changes in nutritional status by changing its size, metabolism and functional properties. This tissue also could be affected in offspring in response to maternal undernutrition, changing the phenotype in adulthood (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006, Mallinson et al., 2007, Toscano et al., 2008). Nutritional interventions in pregnancy determines a consistent cluster of disorders in offspring (Barker et al., 1994; Langley-Evans et al., 2005; Mesquita et al., 2010), process known as “fetal programming” (Lucas, 1990). In recent years, many studies have demonstrated a link between fetal programming and many diseases in a long term, such as cardiovascular disorders, hypertension, osteoporosis, obesity and insulin resistance (Fowden et al., 2006; Kevin & Sinclair, 2007). The last one can alter the metabolic and functional capacity of skeletal muscle (Phillips, 1996; Ozzane et al., 2003).

During fetal development, physiological and biochemical properties of muscle fibers are determinate and this process can be changed according to stimuli, as nutrient availability (Bedy et al., 1982; Wilson et al., 1988; Beermann, 1983; Ozzane, 2003; Mallinson et al., 2007). In fact, undernutrition during critical periods of development can influence muscle fiber formation and development in the offspring by gene downregulation related with the muscle growth process (Bayol et al., 2004).

Studies that examines the effects of undernutrition during the early stages of muscle development in offspring normally include the pregnancy and lactating stages and it is clear that undernutrition before weaning causes permanent effects in skeletal muscle in long term (Bedy et al., 1982; Wilson et al., 1988; Beermann, 1983; Ozzane, 2003). However, undernutrition during pregnancy stages, excluding lactating phase, have show variable responses in skeletal muscle phenotype change in different species, in according to restriction diet type and gestacional period (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006; Malisson et al., 2007; Daniel et al., 2007, Toscano et al., 2009; Huber et al., 2009).

Different pathways regulate skeletal muscle phenotypic changes (Loughna & Brownson, 1996; Bayol et al., 2004; Sandri, 2008) including the myogenic regulatory factors (MRFs), a family of transcriptional factors that control the expression of skeletal muscle specific genes (Hughes et al., 1993; Hughes et al., 1999). The family has four

members: MyoD, myogenin, Myf5, and MRF4. MRFs form dimers with ubiquitous E proteins (e.g. E12 or E47) resulting in heterodimeric complexes that bind to the E-box consensus DNA sequence (50-CANNTG-30) found in the regulatory region of many muscle-specific genes (Murre et al. 1989). These MRFs are critical for establishing myogenic lineage, for the terminal differentiation of myoblasts (Parker et al. 2003) and for the maintenance of adult skeletal muscle phenotype (Lin e al, 1991; Allen et al., 2001). Several studies have suggested that the MyoD transcript is prevalent in fast glycolytic muscle, whereas the myogenin transcript is mainly found in slow-oxidative muscle (Hughes et al., 1993; Voytik et al., 1993).

Recent researchs advances in understanding the cellular and molecular events involved in tissue adaptation in the fetal programming. Considering that little is known about the factors involved with skeletal muscle changes in offspring submitted to maternal protein restriction, we investigated and compared morphological characteristics and MRFs expression in SOL (oxidative and slow twitching muscle), and in EDL (glycolytic and fast twitching muscle) from male offspring from dams fed with low protein diet during all gestational phases.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model

Our experiment was performed in accordance to the Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol No. 081/07-CEEA). The animals had ad libitum access to food and water at all times and temperature-controlled conditions on a 12 h light–dark cycle. Virgin female Wistar rats, body weight between 250 and 300g, were housed individually with males under standardized conditions. After mating, pregnancy was determined by examination of vaginal smears to detect the sperm. Sixteen pregnant rats were isolated and randomly divided into two experimental groups: a control group with dams fed with normal protein diet (17% protein, NP, N= 8) and group with dams fed with isocaloric low protein diet (6,0% protein, LP, N=8). The diets were administered from first day until the end of the pregnancy. The composition of the diets are shown in

Table 1. From offspring birth (day 21), dams had *ad libitum* access to standard rat chow Purina (23% protein), labina, Brazil until offspring weaning. The food intake of dams was measured during all pregnancy phase in both groups.

At birth, the litter sizes were standardized to eight randomly chosen pups, being held four males and four females in each litter. The female pups were not used in the analysis, but were maintained until weaning to maintain equal availability of food between offspring. After weaning, all male rats were fed *ad libitum* with standard rat chow (Purina, Labina, Brazil), containing (w/w) 57.5% starch, 23% protein, 2.5% lipid, 9% cellulose, 8% vitamins and salts, until 16-weeks-old. We studied two groups with 30-days-age (NP and LP Groups) and two with 16-weeks-age (NP and LP Groups): group NP (n=8): offspring born to dams fed with normal proteic diet (17% protein) during all pregnancy; group LP (n=8): offspring born to dams fed with low protein diet (6% protein) during all pregnancy. In each period, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 2:1 solution of ketamine hydrochloride (Ketamine ®) 50mg/ml, and xylazine hydrochloride (Xylazine ®) 20mg/ml, respectively, at a dose of (0.1 ml/100g) and euthanized. Extensor digitorum longus (EDL) and Soleus (SOL) muscles were collected, frozen in liquid nitrogen at -156°C and kept at -80°C.

Histochemical and morphometric analysis

Histological sections (8 µm) from the mid-belly portion of EDL and SOL muscles were obtained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica, Germany) at -24°C and submitted to haematoxylin and eosin stain for general morphological analysis (Figure 1A and B). To determine the muscle fiber type frequency and cross-sectional area (CSA), myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry was performed using preincubation in pH 4.3 for EDL muscle and in pH 4.4 for SOL muscle. EDL muscle showed the pure muscle fibers I, IIA/IID and IIB (Figure 1C). SOL muscle presented pure (I and IIA) and hybrid (IC + IIC) muscle fibers (Figure 1D) (Staron et al., 1999). Muscle fiber type frequency and CSA were determined using an Image Analysis System Software (LeicaQWin Plus, Germany) coupled with a LEICA DM. Counts were performed on

transverse sections of each muscle and the fiber type frequency and area was determined by counting approximately 200 fibers/animal equally distributed over the muscle sample.

Gene Expression Analysis

RNA isolation and analysis

The Gene Expression of MRFs assessed by Real-Time PCR. The Total RNA was extracted from muscle samples with TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), which is based on the guanidine thiocyanate method. Frozen muscles were mechanically homogenized in 1 mL of TRIzol reagent. Total RNA was resuspended in RNase-free water, treated with DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any possible DNA present in sample. Total RNA was quantified using Nanodrop spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), measuring optical density (OD) at 260nm. RNA purity was ensured when OD_{260/280} ratio was around 2.0. And RNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis, which well defined bands were observed correspondents to 18S and 28S ribosomal RNAs.

Reverse transcription

For each sample, cDNA was synthesized from 2µg of total RNA using High Capacity cDNA archive kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Each reaction had 10µL of 10X Reverse Transcription Buffer, 4µL of 25X dNTPs, 10µL of 10X random primers, 100 units of RNase inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 250 units of Reverse Transcriptase MultiScribe™, and the final volume was adjusted to 200µL with nuclease-free water. And cDNA synthesis reaction conditions were: 10 minutes at 25°C for primers annealing and 2 hours at 37°C for reverse transcription. Reaction control was made by omission of the reverse transcriptase enzyme. All cDNA samples were amplified by PCR to ensure that there was no contamination by DNA. The resulting cDNA samples were aliquoted and stored at -20°C. 2µL of cDNA, corresponding to 20ng of total RNA,

Real-time qPCR

The cDNA samples were used as template in real time PCR reactions which were made in 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

with equipment universal thermal cycling conditions: 95°C for 10min, 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1min. The reactions were performed in duplicate using 0.4 μM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with final volume of 25 μL. Gene sequences were selected from the accession numbers in the National Center for Biotechnology Information database (Table 2). Primer sequences were designed using the primer design function of the software Primer Express v3.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Series of five dilutions (10x) was constituted from PCR products diluted 500 times, for each gene, from an initial mixture containing equal amounts of cDNA from all samples, thus were generated a five-point standard curve for each primer set initially chosen for qPCR. qPCR linearity and efficiency were calculated from those standard curves slope, generated by 7300 System SDS software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for each gene analyzed. The analysis of all standard curves showed high linearity ($r^2=0.99$). PCR efficiency (Ex) was calculated from the equation $Ex = 10^{-1/\text{slope}} - 1$. Slope of -3.32 implies in a reaction efficiency of 100%. All genes showed slope around -3.32 and estimates of efficiency were between 98.0% and 100.5%. Gene expression was compared between individual samples using the $\Delta\Delta C_q$ method described by Livak & Schmittgen (2001). It was also necessary to perform the correction of experimental variability between different samples, for example, amount of RNA and reverse transcription reaction efficiency, prior to the final quantification. Data normalization for at least three reference genes is the most accepted method to avoid such disparities (Vandesompele et al., 2002). The choice of appropriate genes is crucial for reliable results, and the expression level of these genes must remain unchanged for different experimental conditions (Alway et al., 2002, Sanchez et al., 2006). Expression level of three genes, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) TATA box binding protein (TBP) and acidic ribosomal phosphoprotein (ARBP), actin beta (ACTB) was assessed through DataAssist software v 2.0. from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and used for normalization as reference genes. The software was also used for relative gene expression quantification.

Protein Expression Analysis

Protein levels of MRFs in SOL and EDL muscles were determined by Western Blot technique, using β -actin protein as normaliser. Muscle samples were homogenized in 400-500 μ L lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride - PMSF, 0.25 mM Na_3VO_4 , 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl pH 7.5). The samples were centrifuged at 11,000 rpm for 20 min at 4°C for supernatant collection. Homogenate fraction was re-suspended in Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/mL bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M b-mercaptoethanol) at 95-100°C during 5 minutes. Quantification of proteins was due to Bradford method, using Bovine Serum Albumin (BSA 0.1%) as standard curve protein. An amount of 50 μ g of total protein was fractioned by one-dimensional SDS-PAGE gel (12%), stained with Coomassie blue, to confirm equal loading of each sample. Proteins were transferred from gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Nonspecific binding sites were blocked using 5% skim milk/Tris-HCl buffered saline-Tween buffer [TBS-T: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20], followed by specific primary antibody incubation overnight at 4°C (Table 3). After three wash steps using TBS-T buffer, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used (Table 3). Procedures ranged according to each specific protein analyzed, varying among blocking solution concentration, blocking time period, primary and secondary antibody dilution.

Immunoreactive protein signals were detected using *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), according manufacturer's recommendations. Signals were captured in a immunoblotting film paper and the bands intensities were quantified using a densitometry analysis software (*Image J software for windows*, version 1.71, 2006, Austria). Values were normalized by β -actin protein results.

Statistical Analysis

The comparison between groups (NP and LP) for muscle fiber cross-sectional area and gene and protein expression values were achieved using the Student's unpaired t test; The muscle fiber frequency was achieved by Mann-Whitney test (Zar, 2009). Significance was assumed at a level of $p < 0.05$.

RESULTS

Food intake in dams during pregnancy

No change was observed in food intake during all pregnancy period in dams LP compared to NP (Figure 2).

Histochemical and morphometric analysis in offsprings

At 30-days-old, no statistical difference was observed in EDL CSA in the fiber types I, IIA+IID and IIB between groups (Figure 3A); however, the SOL muscle of LP group showed decreased CSA in the fiber type I in comparison to SOL CSA of NP group (Figure 3B). At 16-week-old, the same pattern was observed in CSA of EDL (Figure 3C) and in the SOL (Figure 3D) muscles. In relation to muscle fiber-type frequency, in the EDL muscle, an increase in IIB and decreased in I and IIA+IID muscle fiber frequency was observed in LP EDL muscle at 30-days-old. No statistical difference in fiber frequency was observed in the SOL muscle in this period (Table 4). At 16-week-old, the offspring showed no changes in fiber-type frequency in the SOL and EDL muscle (Table 4).

Gene Expression Analysis of MRFs in offsprings

The values of MRFs gene expression are detailed in the Table 5. At 30-days-old and 16-week-old, no changes were observed in MyoD and Myogenin gene expression in EDL and SOL muscles in LP groups compared to NP groups.

Protein Expression Analysis of MRFs in offsprings.

The values of MRFs protein expression are described in the Figure 4. At 30-days-old and 16-week-old, no difference were observed in MyoD and Myogenin protein expression in EDL and SOL muscles in LP groups compared to NP groups.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate and compare morphological characteristics and MRFs expression in SOL (oxidative and slow twitching), and in EDL (glycolytic and fast twitching) muscles from male offspring from dams fed with low protein diet during all gestational phases. We showed that protein-restriction during pregnancy induced SOL hypotrophy in offspring with 30-days-old and 16-week-old and EDL muscle fiber type modulation toward a more fast muscle in LP offspring with 30-days-old only. No differences were observed in MyoD and Myogenin expression in SOL and EDL muscles in LP compared to NP groups.

Skeletal muscles are composed by fiber types that exhibit specific metabolic and functional activities (Pette & Staron, 2000; Fluck & Hoppel, 2003; Magaud et al., 2004); these characteristics can be changed in several conditions (Walters et al., 2000; Psilander et al., 2003; Dow et al., 2004; Jackman & Kandarian, 2004; Magaouda et al., 2004) including protein-energy restriction imposed during the pregnancy. The last point can induce changes in the muscle phenotype in adulthood (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006, Mallinson et al. 2007; Toscano et al., 2008).

In our work, offspring with 30-days-old and 16-weeks-old showed reduced cross sectional area of I fiber type in SOL muscle. Regarding to muscle fiber type frequency no change was observed in this muscle comparing LP to NP groups, in both periods analyzed. According to Mallinson et al., 2007, only during specific stages of gestation, food restriction causes changes in the muscle fiber-type frequency in SOL muscle; the authors observed, in offspring with 4-weeks-old, an increase in SOL I fiber type frequency when the maternal protein restriction (9 versus 18%) occurred only in the early stages of pregnancy (0-7 days), and a reduction in SOL II fiber type frequency was observed when the restrictions was imposed for an intermediate stage of pregnancy (8-14 days).When the

restrictions was imposed for all pregnancy period (0-22 days), SOL muscle fiber type frequency did not change (Mallinson et al., 2007). However, Toscano et al. (2008) observed increase in SOL IIA fiber type frequency in offspring with 25 and 90-days-old in response to protein restriction (7.8 versus 17%) imposed during all pregnancy period (0-21 days). Considering the restriction period used in our study (0-21 days), the SOL muscle fiber type frequency was similar to that shown by Malisson et al (2007). The conflicting results concerning the effects of undernutrition during pregnancy are related to diet type, the gestational period that the diet is used and the diet type used after birth (Fahey et al., 2005; Zhu et al., 2006; Malisson et al., 2007; Daniel et al., 2007, Toscano et al., 2009; Huber et al., 2009). In our study, protein amount diet offered for offspring during postnatal period (23%) was more similar to that used by Malisson et al., (2007) (20%), than that reported by Toscano et al., (2008) (protein amount changing from 17 to 12%). Then, the variations in this parameters can explain the difference in the results related to the SOL muscle fiber type frequency.

The decreased SOL cross section area in type I fiber could be correlated with a reduced SOL muscle weight (data not shown) (Cabeço et al., 2011). SOL muscle is constituted mainly by oxidative and slow muscle fibers that are recruited for continuous and sustained activities (Johnston, 1985); this fibers require a higher protein turnover (David et al., 1989).

We think that, the protein restriction diet used during all pregnancy in our study affected some pathways involved with the protein synthesis and the diet amount protein used during post natal period was unable to recover the CSA in this muscle. This condition can be defined as hypotrophy (Cullen & Mastaglia, 1992). Zhu et al., 2004, showed that, mTOR (mammalian target of rapamycin), factor involved in protein synthesis, was decreased in sheep offspring in response to maternal nutrient restriction. Although the authors also studies the process of proteolytic degradation, they conclude that maternal nutrient restriction has greater effects on the protein synthesis inhibition than on the protein proteolysis (Zhu et al., 2004).

According to Sacks (2004), epigenetic factors could be involved with this process. Specific nutrients availability changes the DNA structure, can modify the gene

expression altering fetal physiology and metabolism; this in turn can predisposes the offspring to diseases.

Regarding to EDL muscle we observed changes in fiber-type frequency only in LP group with 30-days-old. There were an increase in IIB and a decrease in I and IIA+IID fiber type frequency. This result could contribute with EDL insulin resistance pattern. Humans with low birth weight (LBW) in response to maternal undernutrition showed, in vastus lateralis muscle, increased in IID/X, a decrease in IIA and no change in I fiber type frequency; the authors correlated these result with the development of type 2 diabetes (Jensen et al., 2007), also discussed by Toscano et al., 2008. The fact can be explained because the muscles with predominantly type II fibers, have less capacity to respond to insulin as well as low rate of glucose transporter (GLUT4) (Megney et al., 1993; Halseth et al., 2001).

EDL muscle is a fast glycolitic muscle recruited during non sustained fast activities (Johnston, 1985) and have a protein turnover rate lower in comparison to SOL muscle (Davis et al., 1989). During EDL myogenesis, primary fibers are slow and the secondary are fast. In this muscle, the majority of primary slow fibres are modulated for fast fibers. It is possible that a maternal protein restriction used in our experiment have advanced the type II muscle fiber differentiation during the myogenesis (Kelly & Rubinsten, 2003). In LP group with 16-week-old, the EDL muscle showed no change in fiber type frequency. This fact demonstrates that the prolonged time of the diet used post birth allowed to EDL muscle recovered the similar pattern to EDL muscle of NP group.

In our experiment, EDL muscle did not presented hypotrophy. This result is intriguing, once SOL muscle showed this characteristic. However, we need to consider that these muscle presents metabolic and contractile characteristics (Davis et al., 1989) and also myogenic process distincts (Kelly & Rubinsten, 2003). In our opinion, our result related to the CSA reflect the EDL muscle physiology. However, others experiments need to be conducted to best explain this results.

Regarding to MRFs, no change in MRFs expression was observed between LP and NP groups, for both ages and muscles analyzed. The MRFs Myogenin and MyoD have important functions during the development, since they are responsible for the stem

cell proliferation and differentiation to form the muscle fibers (Kronnie & Reggiani, 2002); bind directly to the enhancers and activate transcription of several structural and functional proteins (Brameld et al., 2004).

Although the MRFs are involved in many muscle ontogenetic processes, in our study, the MRFs levels were unaffected in muscle of offspring in response to maternal protein restriction. This result is interesting, since we observed SOL hypotrophy, in both ages analysed and muscle fiber type frequency change in EDL muscle in offspring with 30-days-old. Bayol et al (2004) also showed that the maternal restriction food (50%) did not alter the MyoD gene expression in gastrocnemius muscle of offspring. It is possible that others pathways could be involved with the muscle changes in response to maternal protein restriction. The mTOR can be involved these process, once this factor is decreased in sheep offspring in response to maternal nutrient restriction, inhibiting the muscle protein synthesis (Zhu et al., 2004).

In conclusion, our results indicate that maternal protein restriction induced muscle morphological changes more prominent in SOL (oxidative and slow twitching muscle) and did not alter MyoD and Myogenin expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo to Pesquisa do Estado de São Paulo) Process no 2007/59970-8 and CAPES. This work is part of the Dr. Thesis presented by L.C.C. to São Paulo State University (UNESP) in 2011.

TABLES

Table 1. Composition of the experimental diets.

<i>Ingredient (g/Kg)</i>	<i>Normal-protein diet (17% protein)</i>	<i>Low-protein diet (6% protein)</i>
Cornstarch	397	480
Dextrin	130.5	159
Saccharose	100	121
L-Cystine	3	1
Fiber	50	50
Soybean oil	70	70
Mineral mix AIN93G†	35	35
Vitamin mix AIN93G*	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5

† American Institute of Nutrition 93; mineral mix provided (mg/kg diet): calcium 5.0, phosphorus 1.6, sodium 1.0, potassium 2.3, magnesium 0.5, iron 0.03, zinc 0.03, and copper 0.01. * American Institute of Nutrition 93G; vitamin mix provided (mg/kg diet): nicotinic acid 30.0, calcium pantothenate 16.0, pyridoxine- HCl 7.0, thiamin-HCl 6.0, riboflavin 6.0, folic acid 2.0, biotin 2.0, cyanocobalamin, 25.0, _-tocopherol 150.0, retinyl palmitate 8.0, cholecalciferol 2.5, and phyloquinone 0.75. (Reeves, 1993).

Table 2. Primers used for Real-Time PCR amplification of reverse transcribed RNA Product.

<i>Product</i>	<i>Accession no</i>	<i>Sequence (50–30)</i>
MyoD	NM_176079	F: TTTTTCATGCGACTCACAGC R: GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
Miogenina	M24393	F: GTCTTTTCCGACCTGATGGA R: ATAGAAGTGGGGCTCCTGGT
ARBP*	NM_022402	F: CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG R: AACAGTCGGGTAGCCAATCTG
TBP*	NM_001004198	F: GCCACGAACAACACTGCGTTGAT R: AGCCAGCTTCTGCACAACCTCA
GAPDH*	AB017801.1	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTC
HPRT*	NM_000194.1	F: TGACACTGGCAAAACAATGCA R: GGTCTTTTACCAGCAAGCT
ACTB*	NM_031144	F: CAGGTCATCACTATCGGCAATG R: TTTCATGGATGCCACAGGATTC

Accession No, GenBank accession number. F: primer senso; R: primer anti-senso. GAPDH: Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase, TBP: TATA binding box protein, ARBP: Acidic ribossomal phosphoprotein, HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase, ACTB: Actin beta. * housekeeping.

Table 3. Primary and secondary antibodies used in Western Blot analysis.

<i>Protein</i>	<i>Primary Antibody</i>	<i>Secondary</i>	<i>Manufactur</i>
MyoD	M-318 (sc-760)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	Santa Cruz Biotechnology California, USA
Myogenin	M-225 (sc-576)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	
β-actin	R-22 (sc-130657)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	

Table 4. Frequency fibers type muscle

Muscle	Group with 30-days-old		Group with 16-week-old	
	Group NP (n=6)	Group LP (n=6)	Group NP (n=8)	Group LP (n=8)
EDL (%)				
Type IIB	31.4 (28.7; 45.9)	45.1(40.3;59.6)*	47.0(38.6;50.9)	46.7(37.4;49.6)
Type IIA+IID	55.0 (18.0;61.3)	45.8(26.3;50,8)*	41.0(35.1;44.2)	41.6 (37.1;45,6)
Type I	12.2 (9.2;36.0)	8.8 (6.7;14.0)*	12.8(10.1;18.5)	11.8(9.7;23.1)
SOL (%)				
Type I	56.6(53.1;63.1)	60.0(53.5;67.9)	73.1(56.7;80.9)	77.9(53.3;84.3)
Type IC+IIC	41.3(32.5;43.6)	42.1(36.9;53.1)	18.5(10.4;35.0)	16.7(8.3;41.7)
Type IIA	23.2(18.4; 26.7)	22.9(13.3;31,1)	8.2(6.0;13.6)	5.4(2.4;12.2)

Values are expressed as median (minimum-maximum value). Soleus muscle (SOL) and extensor digitorum longus muscle (EDL). Values that are significantly different from the control group (NP) are denoted by an asterisk (*).

Table 5. Relative gene Expression (RNAm) of myogenic regulatory factors

Muscle	Group with 30-days-old		Group with 16-week-old	
	Group NP (n=8)	Group LP (n=8)	Group NP (n=8)	Group LP (n=8)
EDL				
MyoD	0.95±0.07	0.83±0.20	0.79±0.44	1.07±0.56
Myogenin	0.86±0.17	1.15±1.02	1.10±1.02	0.69±0.21
SOL				
MyoD	1.75±1.03	1.38±0.44	0.84±0.72	1.42±1.11
Myogenin	0.79±0.15	0.69±0.21	1.47±0.32	1.32±0.53

Values are expressed as means ± SD. Soleus muscle (SOL) and extensor digitorum longus muscle (EDL). No statistical difference was observed, $p > 0.05$.

FIGURES

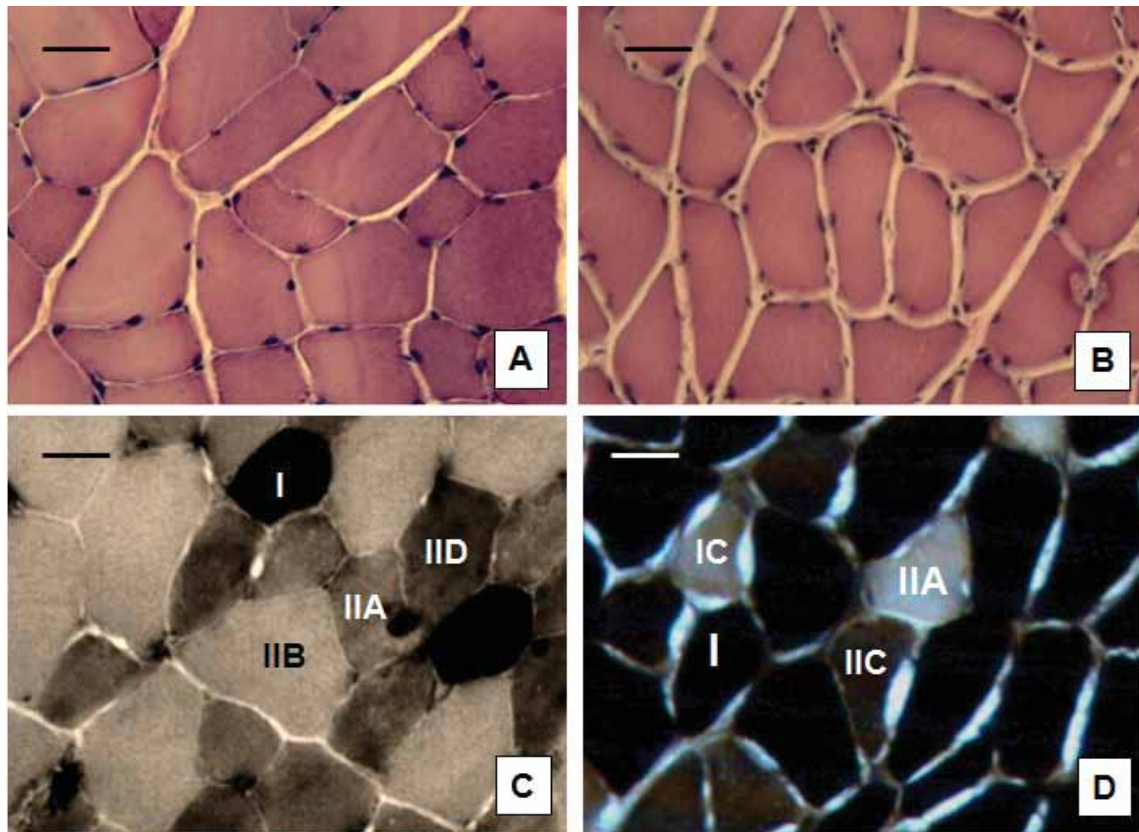


Fig. 1. Cross-section area (CSA) of EDL (A) and SOL (B) muscle showing normal morphology for analyzes with haematoxylin and Eosin. CSA of EDL muscle in pH. 4.3 (C) and SOL muscle in pH 4.4 (D) showing fiber-type distribution using myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemical reaction. Bar 20 μ m.

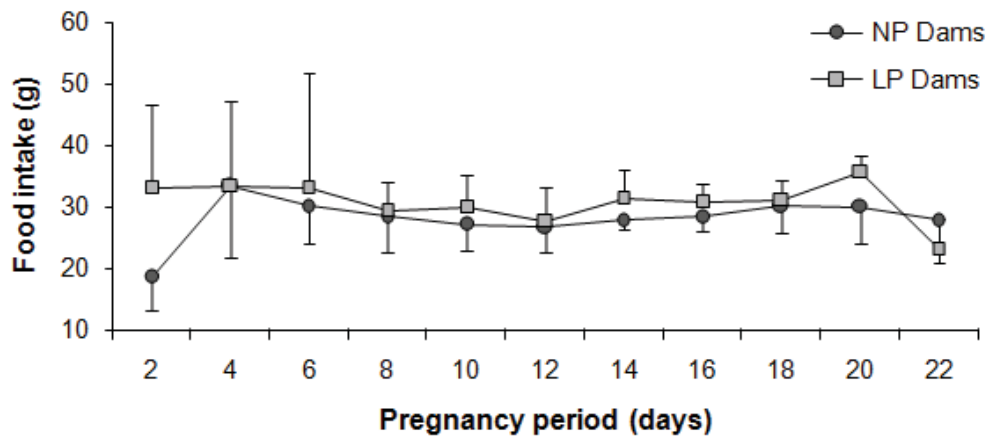


Fig. 2. Food intake from LP and NP Dams during all period of pregnancy. Values expressed as mean \pm SD, $p > 0.05$.

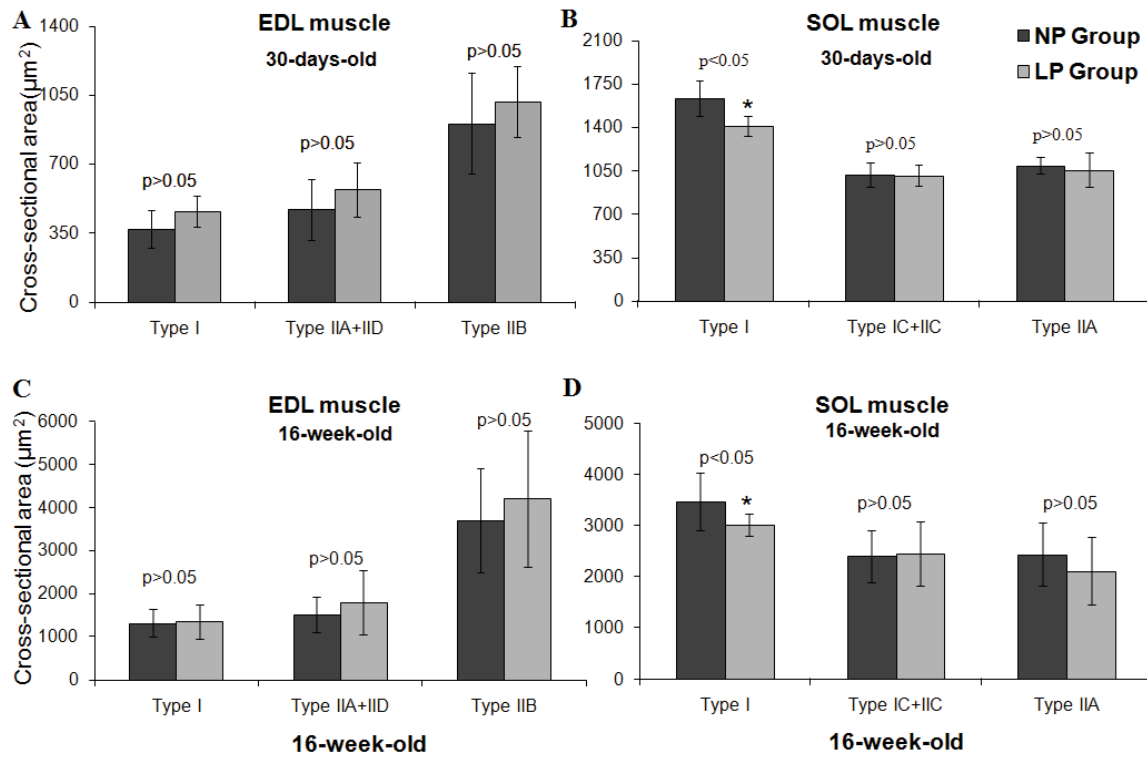


Fig. 3. CSA fiber-type of the EDL (A) and SOL (B) muscles of offspring with 30-days-old and of the EDL (C) and SOL (D) of offspring 16-week-old. Values expressed as mean \pm SD, significant difference for $p < 0.05$.

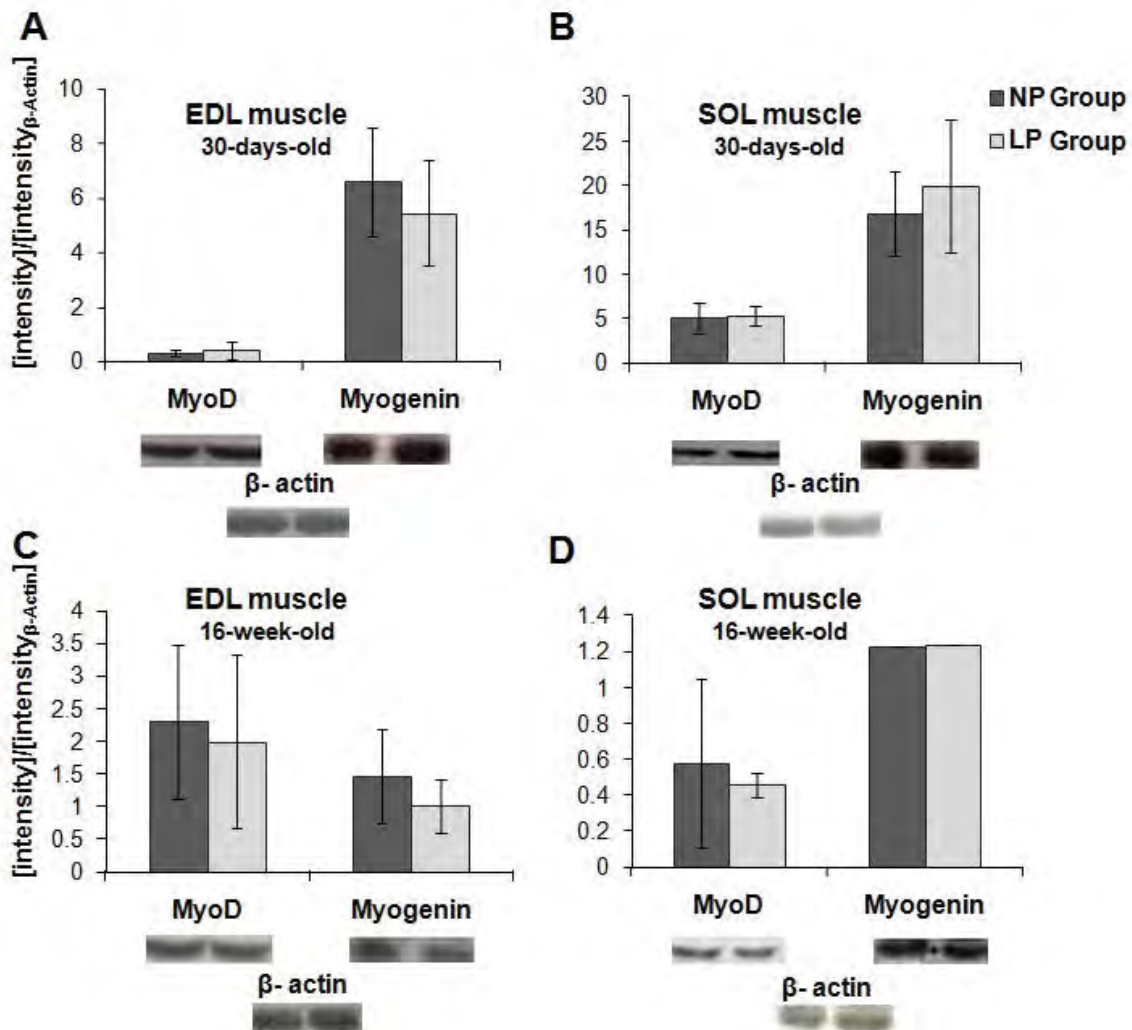


Fig. 4. MyoD and Myogenin protein expression of the EDL (A and C) and SOL (B and D) muscles of offspring with 30-days-old (A and B) and 16-week-old (C and D). Representative bands from the Western blot of MRFs and β -actin also are presented. Values expressed as mean \pm SD, significant difference for $p < 0.05$.

REFERENCES

1. Allen DL, Sartorius CA, Sycuro LK, Leinwand LA (2001). Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *J Biol Chem.* 23; 276(47):43524-33.
2. Bayol S., Jones D., Goldspink G., Stickland N. C (2004). The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr.* 91,331–339.
3. Mesquita, J.A.R. Gontijo and P.A. Boer (2010). Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult Life. *Braz J Med Biol Res*, Volume 43(11) 1010-1018.
4. Barker DJ. Programming the baby (1994). In: Barker DJ, ed. *Mothers, babies, and disease in later life*. London: BMJ Publishing Group, 1994:14.
5. Bedy KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart, JL, Wareham, AC. Early life undernutrition in rats (1982). Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and re-fed adult animal. *Brit J Nutr*, v.47, p.417-431.
6. Waterland RA, Garza C (2002). Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose- responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr* ;132:357.
7. Beermann D. H. Effects of maternal dietary restriction during gestation and lactation, muscle, sex and age on various indices of skeletal muscle growth in the rat (1983). *J Anim Sci* 57:328-337.,
8. Bender A, Bender M. Muscle fiber hypotrophy with intact neuromuscular junctions. *Neurol (Minneapolis)* 1977;27: 206-12.
9. Bischoff, R. *The satellite cell and muscle regeneration*. In: Engel, AG; Franzini-Armstrong, C. *Myology* (vol. 1). USA: Mac Graw-Hill, p. 97-118, 1998. (2003).
10. Brameld, J.M (2007).. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats *Br J Nutri*,v.98, p.292–299.

11. Brameld JM (2004) The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *Br J Nutr* 91:327–328.
12. Cabeço, L.C. P.A.T Souza, E.P. Castan, P.A. Boer, S.M.M Matheus, Dal Pai Silva. M.. Maternal undernutrition changes the neuromuscular junctions (NMJs) and promote catch-up growth in offspring submitted to protein restriction during all pregnancy (artigo em anexo, a ser submetido à *Journal Histology and Histopathology*).
13. Cullen M.F; Johnson M.A; Mastaglia F.L (1992). Pathological reactions of skeletal muscle. *Skeletal Muscle Pathology*. New York and Tokio, 1992.
14. Daniel C. T. R., Brameld J. M, Craigon J., Scollan (2007). D. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition *Z. J. Anim. Sci.* v. 85, p.1565–1576.
15. Davis T. A, Fiorotto M. L; Nguyen H. V.; Reeds, P. J (1989). Protein turnover in skeletal muscle of suckling rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 257:R1141-R1146.
16. Dow DE, Cederna PS, Hasset CA, Kostrominova TY, Faulkner JA (2004). Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve*, 30(1):77-86.
17. Fahey, A.J.; Brameld, J.M.; Parr. T.; Buttery, P.J (2005). The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J. Anim. Sci.* 83, 2564-2571.
18. Fluck M, Hoppeler H (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 160-161.
19. Fowden, A.L.; Giussani, D.A.; Forhead, A.J (2006). Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. *Physiol.* 21,29-37.
20. Halseth A E., Bracy D P, Wasserman D H. Functional limitations to glucose uptake in muscles comprised of different fiber types (2001). *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.280, p.994-999.

21. Huber, K., Mile J. L., Norman, A.M., Thompson, N.M., Davison, M., Breier, B.H (2009). Prenatally Induced Changes in Muscle Structure and Metabolic Function Facilitate Exercise-Induced Obesity Prevention *Endocrinology*. 150(9):4135–4144.
22. Hughes S.M., Taylor J.M., Tapscott S.J., Gurley C.M., Carter W.J., Peterson C.A. (1993) Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118, 1137–1147.
23. Jackman, R.W., Kandarian, S.C (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287, 834–43.
24. Jensen CB., Storgaard H, Madsbad S, Richter EA, Vaag AA (2007). Resistance in Young Men with Low Birth Weight Altered Skeletal Muscle Fiber Composition and Size Precede Whole-Body Insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:1530-1534.
25. Johnston, BY (1985). Sustained force development: specializations and variation among the vertebrates *J. exp. Biol.* 115, 239-251.
26. Kelly AM; Rubinstein NA, 2003. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. *Myology*. 3ª edição , v.1, pag 87: 103,2003.
27. Kevin D., Sinclair R. (2007). Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo *Singh Theriogenology* 67, 43–53.
28. Kronnie GT. Reggian C (2002). Skeletal muscle fibre type specification during embryonic development. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 23: 65–69.
29. Langley-Evans A.C.; Bellinger McMullen S (2005). Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. *Maternal and Child Nutrition*,142–148.
30. Langley-Evans, S.C. (2004) Fetal programming of adult disease: an overview. In: *Fetal Nutrition and Adult Disease Programming of Chronic Disease Through Fetal Exposure to Undernutrition* (ed. SC Langley-Evans), pp 1–20. CABI: Wallingford, UK.
31. Lin H, Yutzey HK; Konieczny SF (1991). Muscle-Specific Expression of the Troponin I Gene Requires Interactions between Helix-Loop-Helix Muscle Regulatory

actors and Ubiquitous Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 11; 267-280.

32. Liu M; Jennifer E. Stevens-Lapsley; Jayaraman A; Ye F Conover C; Walter GA · Bose P; Thompson FJ; Borst SE; Vandenborne K(2010). Impact of treadmill locomotor training on skeletal muscle IGF1 and myogenic regulatory factors in spinal cord injured rats. *Eur J Appl Physiol* 109:709–720.

33. Liu S, Spinner DS, Schmidt MM, Danielsson JA, Wang S, Schmidt (2000). Interaction of MyoD family proteins with enhancers of AchR subunit genes in vivo. *J. Biol Chem.* 275:41364-41368.

34. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402–408.

35. Lopes FS; Carvalho RF; Campos GER; Sugizaki MM; Padovani CR; Nogueira CR; Cicogna AC; Dal Pai-Silva M (2008). Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure *Int. J. Exp. Path.* 89, 216–222.

36. Loughna PT, Brownson C (1996). Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. *FEBS Letters* 390 304-306.

37. Lucas, A (1991). Programming in early nutrition in man. *Ciba Foun Symp.* 156,38-53.

38. Magaudda, L.; Mauro, D.D.; Trimarchi, F.; Anastasi, G (2004). Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl myol*,14(1):17-21.

39. Mallinson, J.E.; Sculley, D.V.; Craigon, J.; Plant, R.; Langley-Evans, S.C.; Brameld, J.M. (2007). Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br J Nutri.*98, 292–299.

40. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Padovani CR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Med Sci Monit* 2010 Nov 30; 16(12):BR374-383.
41. Matsakas A, Patel, K (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli *Histol Histopathol.*24,611-629.
42. Megeney, L.A.; Rudnicki, M.A(1995). Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol*, v.73, n.9-10, p.723-732.
43. Murre, C.; Mccaw, P.S.; Vaessin, H. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, v.58, n.3, p.537-544.
44. Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL (2003). Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol.* 177, 235-41.
45. Pette D. and Staron R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 50, 500-509.
46. Psilander N, Damsgaard R, Pilegaard H (2003). Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 95:1038-1044.
47. Phillips, D. W., Barker, D.J.P., Hales, C. N., First, S. & Osmond, C. (1994) Thinness at birth and insulin resistance. *Diabetologia* 37: 150–154.
48. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nut.*123,1939-51.
49. Sacks, MD (2004). Determinants of Fetal Growth David A. *Current Diabetes Reports*, 4:281–287.
50. Sandri, M (2008). Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* 23:160-170.

51. Staron, R.S., Kraemer, W.J., Hikida, R.S., Fry, A.C., Murray, J.D., Campos, G.E.R (1999). Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult fisher 344 rats. *Histochem. Cell.Biol.* 111, 117-123.
52. Toscano, A.E.; Manhães Castro, R.; Canon, F (2008). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 24(3), 270-8.
53. Vandesompele J, Preter DE, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, Paepe A, Speleman F(2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*v.18;3(7).
54. Voytik S.L., Przyborski M., Badylak S.F., Konieczny S.F. (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. *Dev. Dyn.*198, 214–224.
55. Walters EH, Stickland NC, Loughna PT (2000). The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil.* 21(7):647-53.
56. Wilson S. J., J. J. Ross, and A. J. Harris (1988). A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development* 102:815–821.
57. Zar, J.H (2009). *Biostatistical analysis*, 5th ed, Prentice-Hall, New Jersey, 944.
58. Zhu, M. J., S. P. Ford, P. W. Nathanielsz, and M. Du (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71: 1968-1973.
59. Zhu, M.J; Ford, S.P.; Warrie, J.; Means, W.J.; Hess, B.W.; Nathanielszand, P.W.; Du, M (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J Physiol*, 15; 241–250.

8- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em nosso trabalho permitiram concluir que a restrição protéica materna:

- 1- Induz mudanças morfológicas mais proeminentes nas fibras do músculo sóleo da prole;
- 2- Não altera a expressão dos MRFs MyoD e Miogenina na prole;
- 3- Altera a expressão gênica das subunidades que compõe os nAChR no músculo extensor longo dos dedos na prole com 30 dias de idade;
- 4- Promove alterações ultraestruturais nas JNMs do músculo sóleo somente na prole com 30 dias de idade;
- 5- Promove crescimento compensatório na prole alimentada com dieta contendo 23% de proteínas desde o nascimento até vida adulta.