



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E MOLECULARES DO
MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS JOVENS E
SENIS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA
PERINATAL

Jéssica Silvino Valente

Prof^ª. Dr^ª. Maeli Dal Pai

Dr. Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti

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

Prof^ª. Dr^ª. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Valente, Jéssica Silvino.

Aspectos morfofisiológicos e moleculares do músculo estriado esquelético de ratos jovens senis submetidos à restrição proteica materna perinatal / Jéssica Silvino Valente. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti

Capes: 20100000

1. Músculo esquelético. 2. Restrição calórica. Envelhecimento.

Palavras-chave: Restrição proteica; Envelhecimento; Músculo esquelético.

DEDICATÓRIA

*“ Dedico este trabalho aos meus pais
Teresa e Edson, e a minha irmã
Rafaela. A vocês devo toda minha
força e determinação para seguir em
frente. Sou grata por todo amor,
paciência e dedicação.”*

AGRADECIMENTOS

Realizar este mestrado foi, além da parte profissional, uma realização pessoal. Tive a oportunidade de conviver e conhecer pessoas maravilhosas que me auxiliaram, não apenas cientificamente, a superar cada obstáculo que surgiu durante todo o caminho. Quero agradecer a todas as pessoas que fizeram parte dessa história, me oferecendo sorrisos, solidariedade, se preocupando, torcendo e acreditando em mim.

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar na decisão de continuar em Botucatu e por possibilitar essa conquista.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai, agradeço pela oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa e pela confiança no meu trabalho. Nesses dois anos aprendi e amadureci muito, e tenho certeza que foram momentos essenciais e indispensáveis para o meu crescimento profissional. Muito obrigada!

Agradeço ao meu co-orientador Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti, por toda a ajuda, conhecimento e paciência nesse momento de crescimento.

Agradeço à minha família, meus pais Tereza Silvino Valente e Edson Silvino Valente, e minha irmã Rafaela Silvino Valente, por todo amor, paciência e confiança. Obrigada por todo o sacrifício que fizeram para que eu e minha irmã pudéssemos estudar, tenho orgulho da nossa história, foi realmente, uma caminhada muito linda.

Agradeço minhas amigas de vida e parceiras de laboratório Bruna Zanella e Tassiana Gutierrez, por cada momento compartilhado, todos os almoços, conversas científicas e momentos de distração. Vocês tornaram mais leve os dias mais escuros que tive, obrigada por ficarem comigo.

Aos meus amigos Francielle Mosele, Juan de Nicolai e Ivan Vechetti, por estarem presentes desde o início da graduação e dividirem todas as alegrias e angústias que a pós-graduação pode nos trazer. Continuaremos firmes e juntos, como deve ser.

Aos meus amigos de Mestrado, Ariana, Luan, Luciana, obrigada pela amizade e todo a ajuda nesses dois anos, pelos momentos de descontração e almoços.

Agradeço aos membros do grupo LBME, que foram indispensáveis para que este trabalho fosse concluído. A todos vocês meu imenso obrigado!

Agradeço ao grupo do LABMEC por todo o auxílio durante este trabalho, bem como ao Centro de Microscopia Eletônica Centro de Microscopia Eletrônica do IBB.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB e ao Davi da Pós-Graduação,

por serem prestativos e estarem sempre presentes.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A restrição nutricional durante os períodos de gestação e lactação, pode provocar adaptações fisiológicas no feto (programação fetal), estando relacionada com riscos de doenças cardiovasculares e metabólicas, além de alterações musculares nos adultos. O comprometimento muscular pode trazer consequências futuras na vida do indivíduo, dada a sua relevância na geração de força e locomoção, bem como na longevidade e qualidade de vida em idosos, fase em que ocorre perda de massa muscular (sarcopenia). O objetivo deste trabalho foi analisar aspectos celulares e moleculares, através de técnicas morfológicas e moleculares, dos músculos Sóleo (SOL) e Extensor Longo dos Dedos (EDL) de ratos jovens e senis (21 e 540 dias) provenientes de mães alimentadas com uma dieta de baixo conteúdo protéico (6%) durante a gestação e lactação. Foram utilizados Ratos *Sprague Dawley* aos 21 e 540 dias, provenientes de dois grupos de genitoras submetidas a diferentes dietas (hipoproteica: 6% e padrão: 17% de proteína) durante toda a gestação e lactação. Amostras dos músculos SOL e EDL foram coletadas para as análises morfológica, imunofluorescência e moleculares. Nossos resultados demonstraram que os animais do grupos restritos apresentaram menor peso em ambos os períodos comparado aos animais dos grupos controles. O músculo SOL apresentou diminuição da área de secção transversal (AST) das fibras musculares aos 21 e 540 dias, enquanto o músculo EDL apresentou diminuição da AST apenas aos 21 dias; nenhuma alteração na frequência dos tipos de fibras musculares foi observada nos músculos e nos períodos analisados. Aos 21 dias não foram observadas diferenças na expressão gênica dos marcadores avaliados nos músculos SOL e EDL. Aos 540 dias, no músculo SOL, houve aumento na expressão do gene *IGF-1*, enquanto no músculo EDL, o MRF *MyoG*, apresentou expressão gênica diminuída. As vias alteradas na senilidade decorrentes da restrição proteica perinatal apontadas pelas análises dos transcriptoma envolvem a proliferação e diferenciação celular durante a embriogênese, o metabolismo de lipídeo, integridade da matriz extracelular, citoesqueleto e junção neuromuscular. A restrição proteica durante a gestação e lactação interfere na manutenção do peso corporal durante a fase juvenil e na senilidade e promove hipotrofia muscular aos 21 nos músculos SOL e EDL, observada também aos 540 dias no músculo SOL. Os dados do transcriptoma sugerem uma adaptação (proteção) dos músculos SOL e EDL à condição de restrição proteica perinatal durante a senilidade.

Palavras-chave: Restrição proteica; Envelhecimento; Músculo esquelético.

ABSTRACT

Nutritional restriction during gestation and lactation can cause physiological adaptations in the fetus (fetal programming), being related to risks of cardiovascular and metabolic diseases, as well as muscular changes in adults. Muscle impairment may cause future consequences in the individual's life, given the relevance of this tissue in the generation of strength and locomotion, as well as, the longevity and quality of life in the elderly where muscle loss occurs (sarcopenia). The objective of this work is to analyze cellular and molecular aspects of SOL and EDL muscles of young and senile rats (21 days and 540 days) from mothers fed with a diet of low protein content (6%) during gestation and lactation. Sprague-Dawley rats were used at 21 and 540 days from two groups of mothers submitted to different diets (hypoproteic: 6% and standard: 17% protein) throughout gestation and lactation. Samples of SOL and EDL muscles were collected for morphological, immunofluorescence and molecular analyzes. Our results showed that the animals in the restricted groups had lower weight in both periods compared to the animals of the control groups. The SOL muscle showed a decrease in the cross-sectional area (CSA) of the muscle fibers at 21 and 540 days, whereas the EDL muscle presented a decrease of CSA only at 21 days; no change in the frequency of muscle fiber types was observed in the muscles and in the periods analyzed. At 21 days no differences were observed in the gene expression of the markers evaluated in the SOL and EDL muscles. At 540 days, in the SOL muscle, there was an increase in IGF-1 gene expression, while in the EDL muscle, the MyoG MRF showed decreased gene expression. The altered senile pathways due to perinatal protein restriction indicated by the transcriptome analysis involve cell proliferation and differentiation during embryogenesis, lipid metabolism, extracellular matrix integrity, cytoskeleton and neuromuscular junction. Protein restriction during gestation and lactation interferes with maintaining body weight during the juvenile phase and senility, promotes muscular hypotrophy at 21 in the SOL and EDL muscles, also seen at 540 days in the SOL muscle. The transcriptome data suggest an adaptation (protection) of the SOL and EDL muscles to the condition of perinatal protein restriction during senility.

Key words: Protein restriction; Aging; Skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da causa-efeito da Programação Fetal. (Adaptado de (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006).

Figura 2. Corte transversal do músculo estriado esquelético. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina. Imagem obtida do material analisado neste trabalho.

Figura 3. Corte transversal do músculo SOL (**A**) e EDL (**B**). Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Imagem obtida do material analisado para este trabalho.

Figura 4. Esquema representativo da miogênese, destacando as principais fases de atuação do Pax3, Pax7 e dos MRFs. (Adaptado de DUMONT et al., 2015).

Figura 5. Esquema das principais vias envolvendo genes que controlam o tamanho das fibras musculares (síntese e degradação proteica). Com destaque para os genes mencionados no texto. (Adaptado de BONALDO; SANDRI, 2013).

Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental utilizado.

Figura 7. Animais dos grupos controle e restrito aos 21 e 540 dias (**A**). Peso corporal (g) dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 e 540 dias (**B**). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste T.

Figura 8. Gordura corporal total dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste T.

Figura 9. Corte transversal do músculo SOL dos grupos controle (**A**) e restrito (**B**) dos animais aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulares (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 (**C**). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste T.

Figura 10. Corte transversal do músculo EDL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). (C) Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste T.

Figura 11. Corte transversal do músculo SOL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias (C). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste T.

Figura 12. Corte transversal do músculo EDL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 (C). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste T.

Figura 13. Corte transversal do músculo SOL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa) e Fibras do tipo IIA (verde). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) puras no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 14. Corte transversal do músculo EDL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) puras no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 15. Corte transversal do músculo SOL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$.

Teste *Mann-Whitney*.

Figura 16. Corte transversal do músculo EDL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) puras no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 17. PCA contendo a clusterização das amostras dos músculos SOL e EDL dos animais dos grupos controle (em azul e vermelho) e restrito (em lilas e verde) aos 540 dias. Todas as amostras sequenciadas (A). Amostras consideradas para as análises de bioinformática (B).

Figura 18. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 19. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 20. Níveis de Expressão dos genes genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), e junção neuromuscular (*Raps*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 21. Níveis de Expressão dos genes genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 22. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 23. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 24. Níveis de Expressão dos genes genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad* e *Fmod*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), e junção neuromuscular (*Raps*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

Figura 25. Níveis de Expressão dos genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da ração hipoproteica obtida da empresa PragSoluções

Tabela 2 – Genes com *primers* desenhados a partir de sequências publicadas no *GenBank*

Tabela 3 - Genes com *primers* desenhados a partir do genoma *Rattus norvegicus*

Tabela 4 - Lista final de GDE nos músculos SOL e EDL

Tabela 5 - Genes selecionados para validação diferencialmente expressos no músculo SOL e EDL

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Programação Fetal.....	15
1.2 Músculo Estriado Esquelético	16
1.3. Envelhecimento na Musculatura Estriada Esquelética.....	21
1.4. Programação Fetal e o Músculo Estriado Esquelético	22
1.5. Análise Global.....	24
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVO.....	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Animais e Grupos experimentais	26
4.2. Dados Anatômicos	28
4.3. Análises Morfológicas.....	29
4.4. Bibliotecas de sequenciamento.....	29
4.5. Análises de bioinformática	30
4.6. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)	31
4.6.1. Extração de RNA com TRIzol (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA)	31
4.6.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)	31
4.6.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).....	31
4.7. Análise Estatística	33
5. CAPÍTULO I.....	34
5.1. Dados anatômicos da prole.....	34
5.2. Análises morfológicas	35
5.3. Análise do transcriptoma	43
5.4. Análises moleculares.....	47
5.4.1. Animais com 21 dias.....	47
5.4.2. Animais com 540 dias	49
5.4.3. Resumo dos Resultados	52
6. CAPÍTULO II.....	53
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS	65

9. APÊNDICES.....	77
9.1. Lista de genes <i>up</i>-regulados no músculo Sóleo.....	77
9.2. Lista de genes <i>down</i>-regulados no músculo Sóleo	78
9.3. Lista de genes <i>up</i>-regulados no músculo EDL.....	79
9.4. Lista de genes <i>down</i>-regulados no músculo EDL	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Programação Fetal

A desnutrição é uma condição patológica de desequilíbrio nutricional devido à ingestão insuficiente de nutrientes e/ou calorias, podendo ser aguda quando determinada pelo baixo peso, ou crônica devido a longos períodos de exposição a um ambiente com poucos nutrientes, como o período intrauterino (BEAUCHAMP; HARPER, 2016; PERTILLE et al., 2016). No ano de 2016, 815 milhões de pessoas foram afetadas pela desnutrição, correspondendo à 11% da população global, segundo o relatório da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017).

Juntamente com outros fatores ambientais (utilização de álcool e drogas, doenças e alterações hormonais relacionadas ao estresse), a desnutrição crônica materna em períodos de gestação e lactação é uma das causas para a programação fetal, na qual ocorrem alterações no desenvolvimento da prole em resposta às variações ambientais maternas nos estágios intrauterinos, que levam as possíveis consequências na sua vida adulta (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006; GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008). Tais alterações podem resultar no baixo crescimento fetal e baixo peso ao nascimento, além da possibilidade de desenvolvimento de diversas doenças na vida adulta, como doenças metabólicas e doenças cardiovasculares (Figura 1) (OZANNE; HALES, 1999; BATTISTA et al., 2002; CHEEMA et al., 2005; ZOHDI et al., 2013).

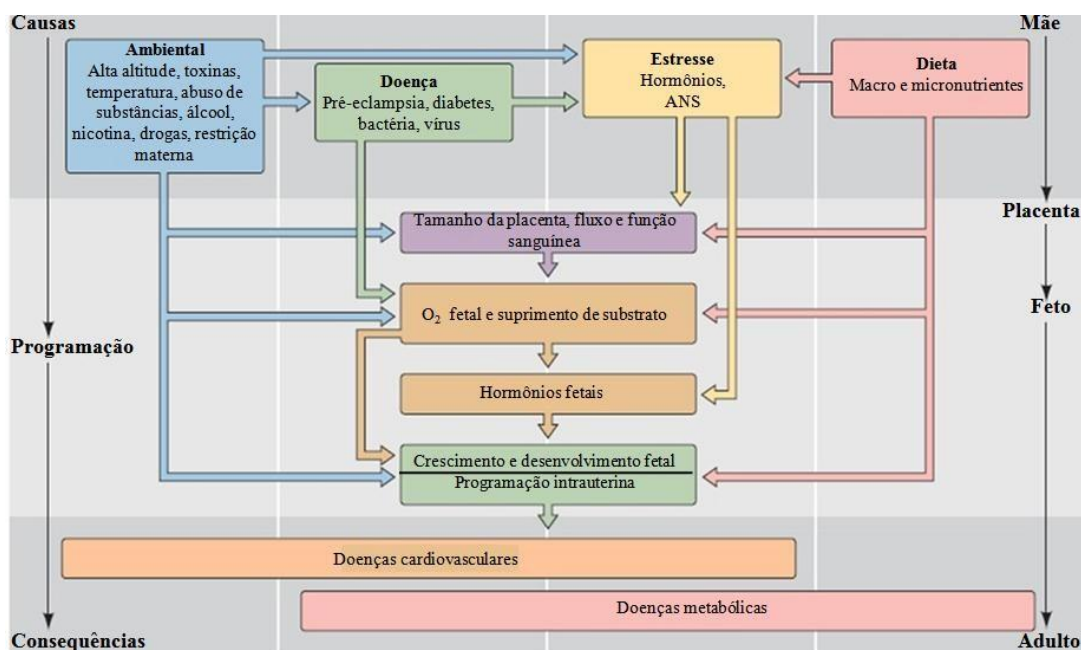


Figura 1. Esquema representativo da causa-efeito da Programação Fetal. (Adaptado de (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006).

Os períodos de gestação e lactação são estados fisiológicos de alto custo energético, pois além da manutenção corpórea materna, a ingestão alimentar deveria cobrir os requisitos extras do embrião/feto e da produção de leite (BEAUCHAMP; HARPER, 2016). Durante a programação fetal, a carência na oferta de nutrientes no período intrauterino promove uma adaptação fisiológica do feto (GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008). Neste sentido, para a sobrevivência da prole, a energia oferecida é direcionada para o crescimento de órgãos-chaves como o cérebro e o coração, em detrimento de outros órgãos, como o músculo esquelético (SYMEON et al., 2015). O comprometimento muscular pode trazer consequências futuras na vida do indivíduo, dada a sua relevância na geração de força e locomoção e na longevidade e qualidade de vida em idosos. Como é um tecido de armazenamento de proteínas e glicogênio, esse fato o torna um grande reservatório energético (SYMEON et al., 2015; SHARPLES; STEWART; SEABORNE, 2016; WU; SATOMI; WALSH, 2017).

As adaptações durante a vida fetal, para assegurar a sobrevivência do indivíduo, são dependentes do suprimento de nutrientes intrauterinos, na expectativa de os indivíduos nascerem em um ambiente semelhante, favorável ao seu desenvolvimento; quando há uma incompatibilidade nutricional entre os ambientes fetal e pós-natal, estas adaptações podem proporcionar ao indivíduo riscos de doenças na vida adulta envolvendo doenças metabólicas e cardiovasculares (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006; GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008). Estudos demonstram que a desnutrição intrauterina provoca alterações em diversos sistemas, como cardíaco e reprodutor, altera o metabolismo energético gerando distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes, além de alterações na musculatura esquelética (OZANNE; HALES, 1999; BATTISTA et al., 2002; BAYOL et al., 2004; CHEEMA et al., 2005; VAAG et al., 2012; CABEÇO et al., 2012; ZOHDI et al., 2013; ELLIS et al., 2014; LOPEZ-LOPEZ et al., 2015; BEAUCHAMP; HARPER, 2016; SANTOS et al., 2018).

1.2 Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é o tecido mais abundante do corpo dos mamíferos, constituindo aproximadamente 50% do peso corporal total, a principal função deste tecido é possibilitar a locomoção e os movimentos do corpo, assegurar a atividade postural e também, servir como principal local de armazenamento de proteínas e glicogênio, além de auxiliar na respiração (SHARPLES; STEWART; SEABORNE, 2016; WU; SATOMI; WALSH, 2017).

As células musculares são denominadas de fibras musculares, apresentam diferentes

características morfológicas, metabólicas e funcionais, permitindo que o tecido muscular seja altamente plástico, com alta capacidade de modulação em resposta a diversos estímulos, como estresse, exercício físico, imobilização, envelhecimento, desnervação e nutrição (LARSSON; ANSVED, 1995; PSILANDER; DAMSGAARD; PILEGAARD, 2003; DOW et al., 2004; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; MAGAUDDA et al., 2004).

As fibras musculares são alongadas, cilíndricas, estriadas e multinucleadas, e os núcleos localizam-se na região periférica, abaixo da membrana plasmática ou sarcolema. Envolvendo as fibras musculares, encontra-se a Matriz Extracelular (MEC), constituída pelo endomísio (envolvendo cada fibra muscular), perimísio (envolvendo fascículos de fibras musculares) e epimísio (envolvendo o todo o músculo), importante para a manutenção da integridade e suporte estrutural, nutricional e funcional do músculo (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Unidades organizadas denominadas sarcômeros, dão o aspecto estriado para a fibra muscular, sendo responsáveis pela contração muscular. Os sarcômeros são constituídos por proteínas estruturais e contráteis, destacando-se as proteínas contráteis miosina (também chamado de filamento grosso formado por moléculas de miosina da classe II) e actina (filamento fino associado às proteínas reguladoras troponina e tropomiosina) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

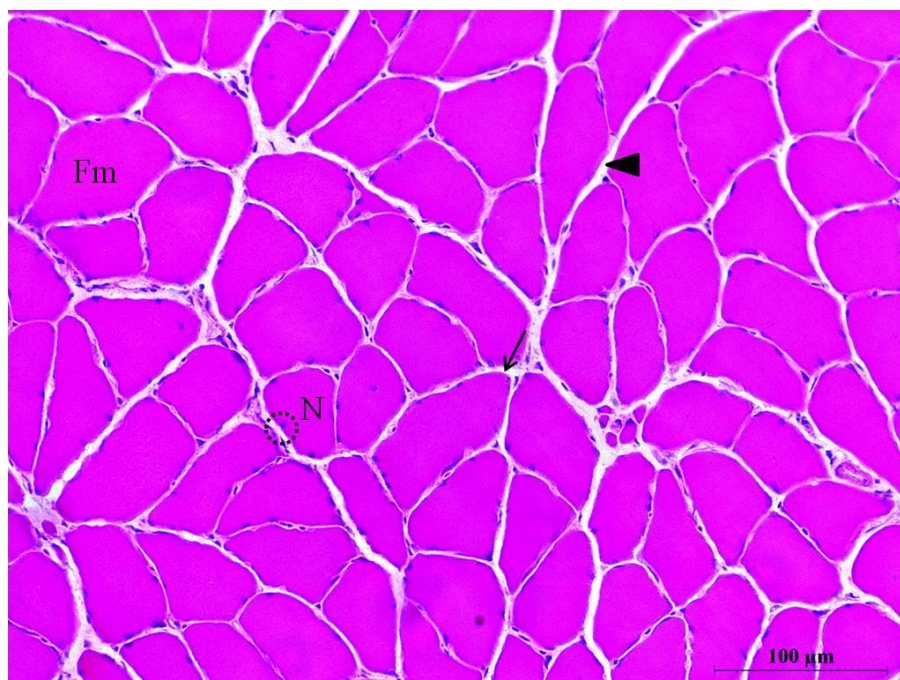


Figura 2. Corte transversal do músculo estriado esquelético. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina. Imagem obtida do material analisado neste trabalho.

A miosina é formada por quatro cadeias leves (MyLC) e duas cadeias pesadas (MyHC) enroladas em α -hélice. A MyHC apresenta uma porção globular que contém um sítio de ligação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP, responsável pela atividade ATPase e liberação da energia necessária para a contração muscular (HUXLEY, 1969; LOWEY et al., 1969; ELLIOTT; OFFER, 1978). Com base na velocidade com que a molécula de ATP é hidrolizada pela enzima ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina (MyHC), as fibras musculares podem apresentar contração lenta ou rápida (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994, 2011; SCHIAFFINO et al., 2013).

As fibras musculares podem ser classificadas como fibras puras, que apresentam apenas uma isoforma da MyHC, podendo expressar a isoforma de MyHC do tipo I (Fibras tipo I) ou expressar uma das três isoformas de MyHC do tipo II (Fibras do tipo IIA, IIX e IIB). As fibras híbridas expressam mais de uma isoforma da MyHC, sendo classificadas como IC, IIC, IIAX e IIXB. Assim, as fibras podem ser distribuídas quanto à presença das isoformas de MyHC: $I \leftrightarrow IC \leftrightarrow IIC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAX \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIXB \leftrightarrow IIB$ (STARON et al., 1999; PETTE; STARON, 2000; WU; SATOMI; WALSH, 2017).

Outra forma de diferenciar os tipos de fibras musculares é em relação às suas características metabólicas, podendo ser oxidativas e/ou glicolíticas. As fibras oxidativas apresentam grande quantidade de mitocôndrias, produzem ATP em abundância, sendo utilizadas para a realização de atividades contínuas e geralmente apresentam contração lenta. Essas fibras musculares apresentam diâmetro pequeno, e pouco glicogênio quando comparada às 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; WOLFSON et al., 1995; PETTE; STARON, 2000; D'ANTONA et al., 2006; SCHIAFFINO et al., 2013; WOLFE, 2006).

As fibras de metabolismo glicolítico são geralmente fibras de contração rápida, apresentam diâmetro maior, poucas mitocôndrias, sendo a irrigação sanguínea e o suprimento de oxigênio menores quando comparado à fibra oxidativa. Essas fibras predominam em músculos que são recrutados em atividade de explosão, porém sua atividade não é duradoura, pois não apresentam apoio metabólico como as fibras oxidativas, fazendo com que elas entrem em fadiga mais facilmente, sendo dependentes de processos rápidos e glicolíticos para gerar ATP (SILLAU; BANCHERO, 1978; CACCIA; HARRIS; JOHNSTON, 1985; STARON et al., 1999; SÄNGER; STOIBER, 2001; SCHIAFFINO et al., 2013;).

Os músculos dos mamíferos são constituídos por uma população heterogênea de fibras

puras e híbridas, que apresentam metabolismo oxidativo e/ou glicolítico, com predominância de um tipo específico, na dependência do fenótipo funcional. Por exemplo, o músculo Sóleo (SOL) apresenta características metabólicas oxidativas, e predomínio de fibras puras do tipo I, de contração lenta, requerido em movimentos de sustentação, enquanto o músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL) tem natureza metabólica glicolítica, sendo de contração rápida, e predomínio de fibras do tipo puras do tipo II, sendo recrutado em atividades mais específicas, como luta, fuga e corrida (Figura 3) (JOHNSTON, 1985; STARON et al., 1999).

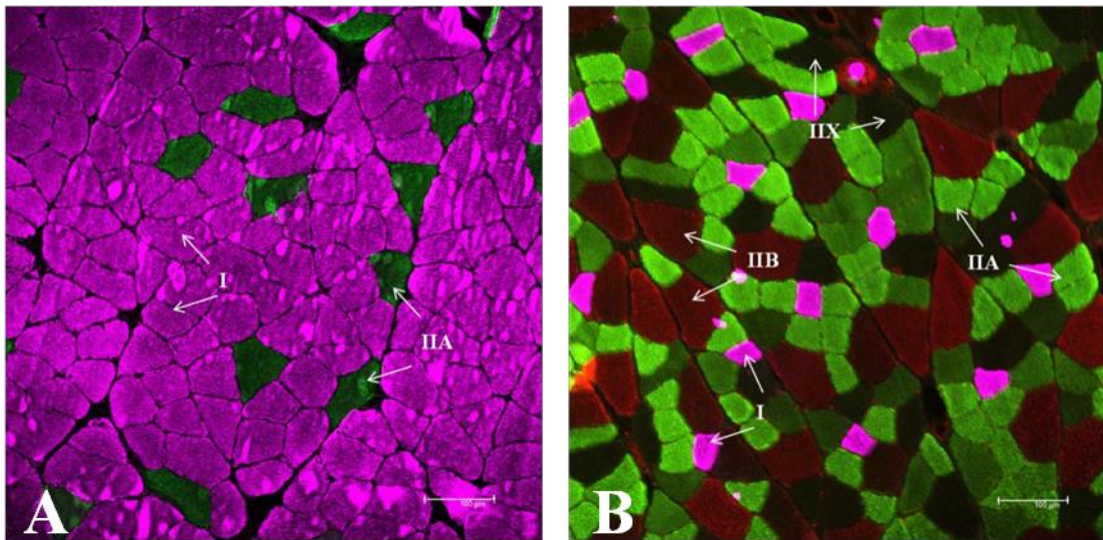


Figura 3. Corte transversal do músculo SOL (A) e EDL (B). Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Imagem obtida do material analisado para este trabalho.

Durante o desenvolvimento embrionário, células somáticas do mesoderma sob a ação de glicoproteínas secretadas pela notocorda e tubo neural, se diferenciam em células precursoras miogênicas (CPM), comprometidas com a formação das fibras musculares (GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). As CPM passam a expressar *Pax3* e *Pax7*, se diferenciam em mioblastos, fundem-se e formam os miotubos que vão se diferenciar em fibras musculares maduras (OLGUIN et al., 2007). Entre os fatores que controlam a miogênese muscular, destacam-se os Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs), fatores transcricionais envolvidos com os processos de proliferação e diferenciação dos mioblastos. A *MyoD* e *Myf5* são MRFs responsáveis pela proliferação dos mioblastos, sendo conhecidos como fatores primários, enquanto a *MyoG* e o *MRF4* são MRFs comprometidos com a diferenciação e formação dos miotubos; são denominados de fatores secundários da miogênese (Figura 4) (MEGENEY; RUDNICKI, 1995; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; ZAMMIT; PARTRIDGE; YABLONKA-REUVENI, 2006; OLGUIN et

al., 2007).

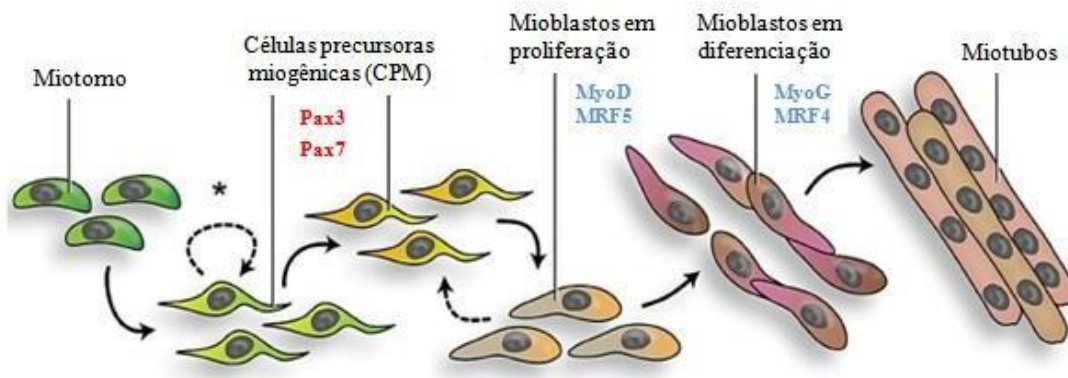


Figura 4. Esquema representativo da miogênese, destacando as principais fases de atuação do *Pax3*, *Pax7* e dos MRFs. (Adaptado de DUMONT et al., 2015).

Embora os MRFs são expressos durante a miogênese, também apresentam um papel importante durante a manutenção, crescimento e reparo muscular (MEGENEY; RUDNICKI, 1995; MOLKENTIN et al., 1996; SABOURIN; RUDNICKI, 2000; SINGH; DILWORTH, 2013). A *MyoG* e a *MyoD* também estão envolvidas na manutenção do fenótipo de contração (rápido ou lento) da fibra muscular adulta, sendo a *MyoG* expressa em níveis superiores aos da *MyoD* em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (HUGHES et al., 1993; VOYTIK et al., 1993). Além do seu papel na diferenciação na miogênese, a *MyoD* também regula a síntese de proteínas da MEC como laminina, colágeno IV e fibronectina, controlando também a expressão de integrinas que facilitam a associação de miofibros com a MEC (VOYTIK et al., 1993).

A manutenção do fenótipo e a homeostase muscular são mantidos através do equilíbrio entre as vias de síntese e degradação proteica, também conhecidas como vias do anabolismo e catabolismo muscular. O catabolismo leva à degradação das miofibrilas e outras proteínas musculares, com perda e/ou redução da força muscular, podendo ocorrer pela ativação de dois principais sistemas: o sistema autofágico – lisossomal e o sistema ubiquitina – proteossoma (UPS) (BODINE et al., 2001; SACHECK et al., 2007; SANDRI, 2010; SCHIAFFINO et al., 2013). O sistema UPS é responsável pela degradação da maioria das proteínas musculares, e nele estão inseridos os atrogenes músculo específico *MAFBx* (*Muscle Atrophy F-box*), responsável por catalisar a degradação de proteínas que promovem a síntese proteica, e *Murf1* (*Muscle RING Finger 1*), catalisador da ubiquitinação e degradação do aparelho miofibrilar do citoesqueleto (BONALDO; SANDRI, 2013; LOPEZ-LOPEZ et al., 2015). As vias do anabolismo promovem o crescimento muscular através da síntese proteica, e como

representante desta via, destaca-se o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*IGF-1*), que atua na modulação da taxa de síntese e degradação proteica muscular, estimulando a hipertrofia no músculo (MURGIA et al., 2000; BODINE et al., 2001; SARTORELLI; FULCO, 2004). O *IGF-1* promove a ativação da *PI3K*, fosforilando a *AKT* tornando-a ativa para fosforilar o *mTOR* e, subsequentemente, a *p70S6K* que atua como potente estimulador da síntese protéica (Figura 5) (GLASS, 2003; STITT et al., 2004).

O balanço entre essas vias permite que o tecido muscular mantenha sua morfologia e função para melhor condição de vida do indivíduo, porém vários fatores podem estimular ou inibir determinada via, como o envelhecimento e a restrição proteica (MCKINNELL; RUDNICK, 2004).

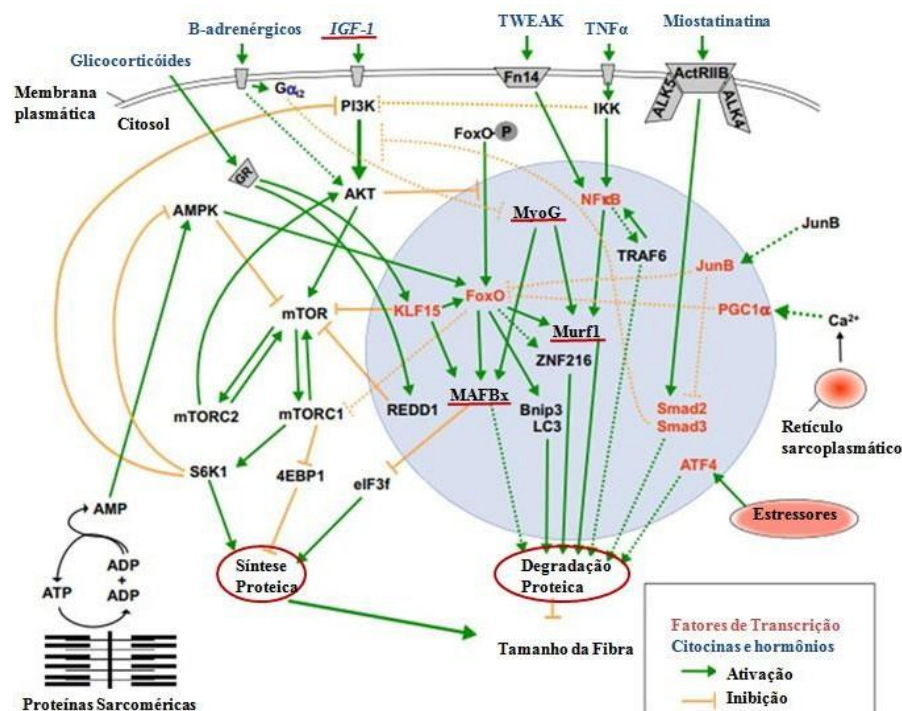


Figura 5. Esquema das principais vias envolvendo genes que controlam o tamanho das fibras musculares (síntese e degradação proteica). Com destaque para os genes mencionados no texto. (Adaptado de BONALDO; SANDRI, 2013).

1.3. Envelhecimento na Musculatura Estriada Esquelética

A população idosa (indivíduos com 60 anos ou mais) vem crescendo nos últimos anos, aumentando 16% entre os anos de 2012 e 2016 (IBGE, 2017).

Durante o envelhecimento ocorre um processo fisiológico denominado sarcopenia, resultando na diminuição de 25% da massa muscular em indivíduos com mais de 75 anos,

adicionado a isso e a redução da força muscular, a diminuição da independência e da capacidade funcional dos idosos aumenta o risco de quedas e fraturas, o que faz com que a sarcopenia seja considerada um importante preditor de mortalidade, estando associada com baixa qualidade de vida dos indivíduos (JANSSEN; HEYMSFIELD; ROSS, 2002; SHORT et al., 2004; JANSSEN, 2006; SAKUMA; YAMAGUCHI, 2012; WU; SATOMI; WALSH, 2017). Indivíduos idosos nem sempre são ativos fisicamente, o que aumenta a susceptibilidade a atrofia muscular (diminuição da massa muscular) devido ao desuso (BROOKS; FAULKNER, 1994; FAVIER; BENOIT; FREYSSENET, 2008). Estudos demonstram que em idosos, 30% da massa muscular é reduzida após duas semanas de imobilização, e que eles diminuem em três vezes suas habilidades funcionais, como ficar em pé e andar (JANSSEN; HEYMSFIELD; ROSS, 2002; CARLSON et al., 2009).

Além da atrofia acentuada, outras alterações na fisiologia decorrentes do envelhecimento são descritas, como a diminuição da capacidade regenerativa, aumento na fadiga muscular causada pela diminuição da capacidade oxidativa e o acúmulo de lipídeos (JOHANNSEN et al., 2012; LAYEC; HASELER; RICHARDSON, 2013; DOMINGUES-FARIA et al., 2016). Essas alterações podem ser atenuadas com a prática de hábitos de vida saudável, como a prática de exercícios físicos e uma alimentação adequada, sendo que o histórico de saúde e hábitos de vida em geral, como consumo de drogas, álcool e cigarro, também são importantes para contribuir para a melhora ou piora das alterações observadas no envelhecimento (KIM et al., 2005; LEANDRO et al., 2012; PILEGGI et al., 2016).

1.4. Programação Fetal e o Músculo Estriado Esquelético

Dado que as características morfológicas e funcionais das fibras musculares são determinadas durante a embriogênese, fatores maternos como a restrição proteica na gestação e lactação, podem comprometer a formação muscular, com consequências na vida adulta (HUGHES et al., 1993; ZHU et al., 2006; MALLINSON et al., 2007; BAAR, 2010). Segundo Fowden; Giussani e Forhead, (2006), a restrição de proteínas durante a gestação altera o fluxo de transporte de aminoácidos na placenta, e essa redução associada à baixa disponibilidade de aminoácidos acessíveis para o feto promovem alterações funcionais e estruturais que podem permanecer até a vida adulta.

No tecido muscular, as alterações resultantes da programação fetal provenientes da restrição nutricional materna, incluem alterações moleculares, nas vias miogênicas e nas vias

de síntese e degradação proteica, e morfológicas, como a diminuição no peso muscular, no tamanho e na frequência dos tipos de fibras musculares (BAYOL et al., 2004; ZHU et al., 2004; MALLINSON et al., 2007; TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008; CABEÇO et al., 2012; RUIZ-ROSADO et al., 2013; CONFORTIM et al., 2015; RAJA et al., 2016; ZOU et al., 2017).

Toscano, Manhães-de-Castro e Canon, (2008) demonstraram que a restrição proteica (7,8%) durante todo o período gestacional, promoveu a redução no peso absoluto dos músculos SOL e EDL na prole aos 25 e 95 dias de idade; observaram também o aumento das fibras tipo IIA no músculo SOL e, aumento das fibras tipo IIB e diminuição das tipo IIA no músculo EDL. Ruiz-Rosado et al., (2013), utilizando uma privação crônica alimentar (50% a menos de ingestão alimentar do grupo controle) durante toda a gestação e lactação, observaram um aumento na frequência das fibras do tipo IIA e IIX, e diminuição das fibras IIB no músculo EDL, de ratos aos 15 a 54 dias. Mallinson et al., (2007), observaram que a restrição protéica (9%) durante diferentes fases gestacionais levam a alterações distintas no músculo SOL. Os autores observaram um aumento da proporção de fibras do tipo I em resposta a restrição protéica nas fases iniciais da gestação; redução na proporção das do tipo II, na fase intermediária da gestação; e nenhuma alteração na proporção de fibras foi observada quando a restrição foi imposta durante todo o período gestacional. Por outro lado, Bayol et al., (2004), não observaram alterações na frequência dos tipos de fibras musculares decorrentes da restrição proteica gestacional (40 e 50% da dieta dos grupos controles), avaliando os músculos semitendinoso e gastrocnêmio aos 21 dias.

Zhu et al., (2004), demonstraram um efeito maior na diminuição da síntese do que no aumento da degradação proteica muscular em fetos bovinos, cujas mães sofreram uma restrição calórica de 50% nos dias gestacionais 28 até 78. Os autores mostraram uma regulação negativa da sinalização da expressão de genes relacionados a síntese proteica (*mTOR*), enquanto nenhuma diferença foi observada nas proteínas de degradação (ubiquitinação). Cabeço et al., (2012), utilizando o protocolo de restrição proteica (6%) durante toda a gestação, não observaram alterações nos genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*) nos músculos SOL e EDL de ratos aos 30 e 112 dias. Raja, et al., (2016), utilizaram cultura celular primária de cordeiros recém-nascidos, provenientes de genitoras submetidas a restrição calórica (60% a menos que os controles) durante toda a gestação. Os autores observaram em 24h de cultura, um aumento da expressão dos MRFs *MyoD* e *MyoG*, porém sem alterações no *Myf5* e *MRF4*. Zou et al., (2017), observaram que porcos aos 55 e 90 dias gestacionais, provenientes de mães restritas (13% a

menos de energia com relação ao controle) apresentavam um padrão de expressão diferencial nos MRFs. A expressão gênica dos MRFs *MyoG* e *MRF4* se encontravam diminuídos em ambos os períodos gestacionais analisados, enquanto os MRFs *MyoD* e *Myf5* apresentavam esta alteração apenas aos 90 dias.

Embora existam estudos demonstrando os efeitos da programação fetal na musculatura esquelética, decorrente da restrição nutricional materna, muitas divergências são observadas, provavelmente, devido à ampla disponibilidade de protocolos para essa condição. As variedades de protocolos envolvendo programação fetal, incluem o tipo e grau de restrição (podendo ser calórica ou proteica, leve ou severa), os períodos de exposição (podendo ser durante os períodos iniciais, tardios, ou ainda durante toda a gestação, envolvendo ou não a lactação), e o período de análise da prole (podendo ser em embriões, jovens, adultos ou senis) (CABEÇO et al., 2012; RAJA et al., 2016; TARRY-ADKINS et al., 2016; CASTRO et al., 2017; CONFORTIM et al., 2017; DE BRITO ALVES et al., 2017; ZOU et al., 2017). Após o tratamento nutricional materno intrauterino, a prole pode receber uma alimentação adequada ou seguir com a restrição; além de protocolos envolvendo dietas hipercalóricas tanto nas genitoras quando na prole. Devido aos diferentes protocolos disponíveis, ocasionando resultados e alterações musculares muito distintas, a utilização de uma análise global, através do transcriptoma, permite uma melhor visualização das possíveis alterações moleculares, envolvendo as vias de sinalização que controlam o fenótipo muscular na prole de mães submetidas à desnutrição proteica no período perinatal.

1.5. Análise Global

Ferramentas computacionais tem sido amplamente utilizadas para análises dos níveis de expressão de transcritos, permitindo a obtenção de informações globais em relação ao perfil transcricional do tecido estudado, possibilitando a interpretação de elementos do genoma para melhor compreensão dos mecanismos de doenças ou alterações moleculares em um estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica específica. Estas técnicas auxiliam na identificação de genes que se encontram diferencialmente expressos e possibilitam avaliar modificações pós transcricionais (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010; YANG; KIM, 2015).

Bibliotecas virtuais são criadas, contendo informações gênicas e, com a aplicação de técnicas de bioinformática essas informações são utilizadas para auxiliar na detecção de possíveis novos alvos gênicos. Assim, para melhor caracterizar as alterações do músculo esquelético no envelhecimento, em ratos submetidos à restrição proteica perinatal, a análise do

transcriptoma possibilitaria estabelecer uma possível relação entre a desnutrição intrauterina, o músculo estriado esquelético e o envelhecimento, auxiliando no melhor entendimento das adaptações musculares que ocorrem nesta condição.

A hipótese deste trabalho é que a restrição proteica (6% de proteína) nos períodos de gestação e lactação promovem alterações morfológicas e moleculares no músculo esquelético de ratos jovens e senis.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de análises morfológicas, moleculares, bem como o a análise global (transcriptoma), utilizando ferramentas de bioinformática, possibilitará o melhor entendimento das alterações musculares que ocorrem na prole de genitoras submetidas à restrição proteica durante a gestação e lactação, nas fases juvenil e na senilidade.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Analisar aspectos celulares e moleculares dos músculos Sóleo (SOL) com predominância de fibras de contração lenta, com metabolismo oxidativo e caracterizado como postural, e Extensor Longo dos Dedos (EDL) com predominância de fibras de contração rápida, metabolismo glicolítico e caracterizado como locomotor, de ratos *Sprague Dawley* jovens e senis (21 e 540 dias) provenientes de mães alimentadas com uma dieta de baixo conteúdo protéico (6%), durante a gestação e lactação.

3.2. Objetivos Específicos

Analisar os seguintes parâmetros, nos músculos SOL e EDL:

- A área de secção transversal (AST) das fibras musculares em cortes histológicos submetidos à coloração Hematoxilina e Eosina (HE), aos 21 e 540 dias;
- A frequência dos tipos de fibras musculares puras (I, IIA, IIX e IIB) por Imunofluorescência, aos 21 e 540 dias;
- A expressão de genes catabólicos (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do gene anabólico (*IGF-1*), e do fator de crescimento muscular (Mostatina) por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real após Transcrição Reversa (RT - qPCR), aos 21 e 540 dias;

-A análise global dos mRNAs (genes diferencialmente expressos), pelo Transcriptoma, aos 540 dias.

-Validar por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real após Transcrição Reversa (RT - qPCR) genes selecionados após a análise do transcriptoma, envolvidos com a proliferação e diferenciação celular durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), gene relacionado ao metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), genes estruturais relacionados com a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), gene relacionado com citoesqueleto (*Hspb7*) e o gene envolvido com junção neuromuscular (*Rapsn*).

4. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos machos e fêmeas (linhagem *Sprague Dawley*), no qual após a constatação da prenhez, as genitoras foram divididas em dois grupos iniciais, o grupo controle (ração padrão - normoproteica com 17% de proteína) e o grupo restrito (ração hipoproteica - 6% de proteína), durante toda a gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Após o período de lactação, aos 21 dias pós-natal, a prole macho foi dividida em dois grupos experimentais, no qual o primeiro grupo recebeu a morte humanitária aos 21 dias. O restante da prole, recebeu ração padrão até o final do experimento, totalizando 540 dias. Em ambos os períodos amostras do músculo SOL e EDL foram coletadas para análises morfológicas e moleculares.

4.1. Animais e Grupos experimentais

Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* pesando de 250 a 300 g, machos (n=10) e fêmeas (n=30) na idade reprodutiva (aproximadamente 3 meses) fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, em caixas de polietileno, sendo um animal por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de temperatura mantida entre 22 e 25°C, umidade relativa próxima de 55%, luminosidade e fotoperíodo de 12 horas (período de luz 07:00-19:00h), sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*. A limpeza das caixas foi realizada duas vezes por semana e os dejetos foram descartados em sacos brancos de resíduos infectantes e destinados ao posto de coleta para incineração. Após o período de adaptação, os ratos foram distribuídos de maneira aleatória para reprodução. O experimento foi

conduzido de acordo com o *Arrive Guideline* (KILKENNY et al., 2010), procedimentos experimentais seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (CEUA- 573).

Após acasalamento e constatação da prenhez, 30 ratas foram colocadas em gaiolas individuais para compor dois grupos experimentais: Grupo Genitora Controle (n=15) composto por genitoras alimentadas com ração normoproteica (padrão - 17% de proteína) para ratos durante toda a gestação e lactação, sendo essa ração fornecida para roedores atendendo as exigências nutricionais, e Grupo Genitora Restrito (n=15) composto por genitoras alimentadas com ração hipoproteica (6% de proteína) durante toda a gestação e a lactação. A ração padrão para ratos foi fornecida pelo Instituto de Biociências de Botucatu/ UNESP e a ração hipoproteica foi obtida da empresa PragSoluções (Tabela 1). A quantidade de proteína presente na ração hipoproteica foi estabelecida a partir da sua utilização em outros trabalhos que analisaram a programação fetal proveniente da restrição proteica materna (CABEÇO et al., 2012; RINALDI et al., 2013; CASTRO et al., 2017; SANTOS et al., 2018). Foram utilizados para a fase experimental 120 filhotes machos. Imediatamente após o nascimento foi padronizado o número de animais para 8 filhotes por rata, na proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre que possível, de forma que não ocorressem alterações no cuidado da mãe com a prole.

Tabela 1 – Componentes da ração hipoproteica obtida da empresa PragSoluções

Ingredientes	Normoproteica (17% de proteína) g/kg	Hipoproteica (6% de proteína) g/kg
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou pH 102 (microcelulose)	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

** para conhecer composição detalhada do mix de sais e vitaminas, consultar Reeves, Nielsen and Fahey, 1993. A Dieta é elaborada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brasil)

Após o desmame (21 dias) os primeiros grupos experimentais foram coletados (gupo

controle proveniente de mães alimentadas com ração padrão durante a gestação e lactação; grupo restrito proveniente de mães alimentadas com ração hipoproteica durante a gestação e lactação), o restante dos animais foi alimentado com ração padrão e água filtrada *ad libitum*, e divididos em dois subgrupos até 540 dias (Figura 6).

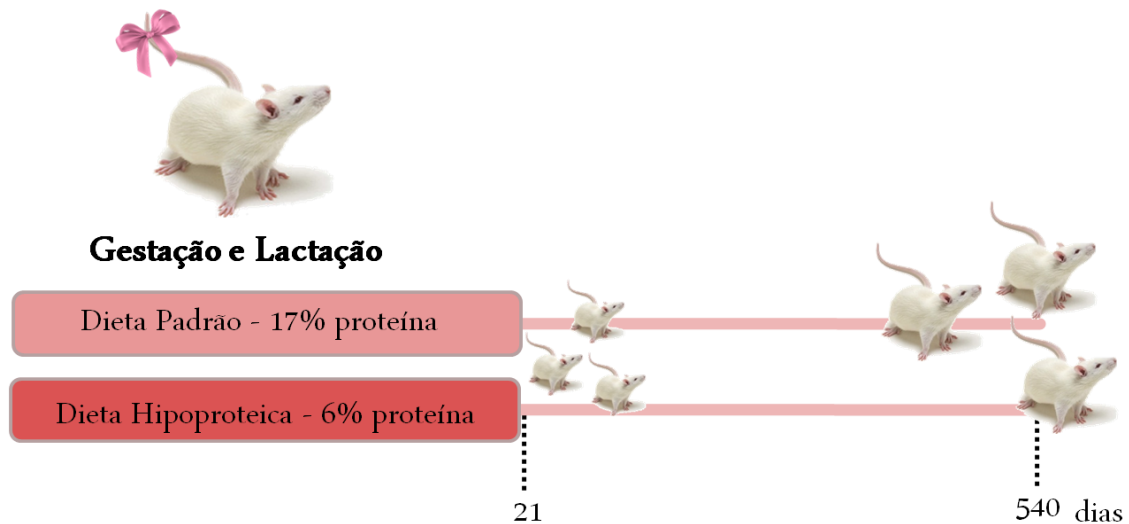


Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental utilizado.

- Grupo experimental Controle (n=8 por período experimental – 21 e 540 dias): filhotes provenientes das mães alimentadas com ração padrão (17% de proteína) para ratos durante toda a gestação e lactação;
- Grupo experimental Restrito (n=8 por período experimental – 21 e 540 dias): filhotes provenientes das mães alimentadas com ração hipoproteica (6% de proteína) durante toda a gestação e a lactação.

4.2. Dados Anatômicos

Durante todo o período do experimento foram monitorados o peso corporal dos animais. Ao final do experimento os animais foram pesados e a morte humanitária realizada, os músculos SOL e EDL foram coletados e submetidos a análises morfológicas e moleculares.

4.3. Análises Morfológicas

Amostras do músculos SOL e EDL foram fixadas a um bloco de cortiça, cobertos com uma fina camada de *Tissue Tek Composto* OCT (Sakura Finetek) e, em seguida, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até as análises subsequentes.

Para a mensuração da área de secção transversal (AST), cortes histológicos (10µm) foram obtidos em um criostato a -20°C e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina para análise da morfologia. Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (*Leica Qwin*) foram feitas fotos no aumento de 20x de 4 campos aleatórios por animal/músculo para a mensuração de aproximadamente 400 fibras, e a análise da AST foi realizada através do software *Image J*.

Para identificação da frequência dos tipos de fibras musculares, os músculos congelados foram seccionados (7 µm), e logo após a realização dos cortes, foram submetidos a técnica de Imunofluorescência. Para imunomarcagem dos tipos de fibras musculares as amostras foram hidratadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários específicos (Miosinas do Tipo I: BA.D5 IgG2b (1:100); Tipo IIA: SC.71 IgG1 (sobrenadante); Tipo IIB: BF.F3 IgM (sobrenadante) (*Developmental Studies Hybridoma Bank*) por 90 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação com os anticorpos secundários específicos (Goat anti-ms IgG2b, Alexa Fluor 647 (Cy5-rosa) conjugated 2 nd AB (1:250) (Invitrogen, A21242); Goat anti-ms IgG1, Alexa Fluor 488 (verde) conjugated 2 nd AB (1:500) (Invitrogen, A21121); Goat anti-ms IgM, Alexa Fluor 555 (vermelho) conjugated 2nd AB (1:250) (Invitrogen, A-21426)) por 60 minutos à temperatura ambiente; as fibras do Tipo IIX foram contabilizadas como as que não foram coradas, se apresentando de forma preta. Entre as incubações com os anticorpos primários e secundários, os cortes foram lavados com PBS, posteriormente fixados em metanol e montados com meio de montagem *Vectashield fluorescente* (H-1000 - Vector Laboratories). As imagens foram capturadas com um Microscópio Confocal TCS SP5 (Leica Microsystems, UK), pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, e analisadas através do software *Image J*.

4.4. Bibliotecas de sequenciamento

Amostras de músculos SOL e EDL dos grupos controle e restrito dos animais com 540 dias (n=3 por grupo/músculo), foram extraídas para a obtenção do RNA total.

Para a extração de RNA total, fragmentos dos músculos SOL e EDL previamente congelados em nitrogênio líquido foram processados utilizando o protocolo do *TRIzol*, descrito

abaixo, seguindo as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspenso em Água Ultrapura e armazenado a -80 °C. A qualidade da extração e quantificação do RNA foram verificadas através do espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE HealthCare, EUA), e a integridade (*RNA Integrity Number*, *RIN*) foi obtida através da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA) (FLEIGE; PFAFFL, 2006). As amostras utilizadas para o sequenciamento apresentaram RIN igual ou superior a 8. Todo o processo de preparação de bibliotecas e sequenciamento foi realizado via *LCSciences*, em Houston TX, e as amostras foram enviadas de acordo com as especificações do laboratório.

O material foi então submetido ao sequenciamento com base na plataforma *next-generation Illumina - HiSeq*. Os dados resultantes foram disponibilizados por meio de um link FTP, e transferidos ao Laboratório de Biologia do Músculo Estriado – LBME.

4.5. Análises de bioinformática

As análises dos dados obtidos por meio dos sequenciamentos foram realizadas com base em uma estrutura computacional de alto desempenho localizada no LBME que consiste em uma estação de processamento de dados baseada em um total de 64 *gigabytes* de memória e 24 núcleos de processamento. Em termos de *software*, o ambiente de processamento de dados se deu através do sistema operacional *GNU/Linux*, com base na distribuição *Linux Mint* 18.3 (disponível em <http://www.linuxmint.com>).

Os dados foram primeiramente analisados quanto à qualidade de leitura do sequenciamento por meio do *software FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) versão 0.10.1. Após a análise de qualidade, os dados passaram por um processo de filtragem de qualidade e remoção de adaptadores por meio do *software Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Após a filtragem e remoção dos adaptadores, as bibliotecas foram então alinhadas contra o genoma de referência de *Rattus norvegicus* por meio do *software Hisat2* (LI; DEWEY, 2011). O *software feature Counts* (LIAO; SMYTH; SHI, 2014) foi empregado no sentido de extrair os números de *reads* alinhados contra cada gene anotado, possibilitando a análise de expressão diferencial por meio do pacote *R/Bioconductor DESeq2* (ANDERS; HUBER, 2010) que resulta em valores de *log2 Fold Change* e valor p ajustado para cada gene detectado. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando *log2 Fold Change* > 1 e valor p ajustado < 0.05.

4.6. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (BUSTIN et al., 2009).

4.6.1. Extração de RNA com TRIzol (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA)

Para a extração de RNA total, fragmentos dos músculos SOL e EDL dos animais aos 21 e 540 dias, previamente congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 ml de *TRIzol*/50-100 mg de tecido, conforme as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspenso em Água Ultrapura e armazenado a -80 °C. A quantificação do RNA foi verificada através do espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE HealthCare, EUA). A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number, RIN*), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA) (FLEIGE; PFAFFL, 2006). Após esta etapa, foi realizado o tratamento do RNA com Dnase, conforme as instruções do protocolo *Dnase I–Amplification Grade* (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA).

4.6.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante. Foram utilizados 1 µg de RNA total obtido do músculo esquelético para a realização da técnica.

4.6.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *PowerSYBR®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* (2,5X), primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água-Ultrapura suficiente para um

volume final de 25 µL de solução. Os primers para genes analisados relacionados a vias de catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), anabolismo (*MyoD* e *MyoG*) e crescimento muscular (*IGF-1* e *Miostatina*) foram desenhados através do software *Primer Express®* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), a partir de sequências publicadas no *GenBank* (www.pubmed.com), enquanto os *primers* dos genes selecionados a partir dos dados do *RNASeq* foram desenhados com base no genoma *Rattus norvegicus* disponível na rede, e sintetizados pela Exxtend Soluções em Oligos (Tabela 2 e 3). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Quant Studio* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Ct comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando o *Data Assist 2.0* (Life Technologies).

Tabela 2 – Genes com *primers* desenhados a partir de sequências publicadas no *GenBank*

Genes	Nº Acesso
<i>PPIA</i>	NM_017101.1
<i>MAFBx</i>	NM_133521.1
<i>Murf1</i>	NM_080903.1
<i>MyoD</i>	NM_176079.1
<i>MyoG</i>	NM_017115.2
<i>IGF-1</i>	NM_001082477.1
<i>Miostatina</i>	NM_019151.1

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no *GenBank*

Tabela 3 - Genes com *primers* desenhados a partir do genoma *Rattus norvegicus*

Identificação Primers	Sequência Primers
<i>Apq7</i> F	5' GTTTGCGTTCTTGGGGTGTC 3'
<i>Aqp7</i> R	5' ACGGGATGGGTTGATTGCAT 3'
<i>Chad</i> F	5'TTCCGCTGGAGAGACTACTGA 3'
<i>Chad</i> R	5' CGGGGTGGCTATAGGGAGT 3'
<i>Fmod</i> F	5' TGGATGGGAACGAGATCAAGC 3'
<i>Fmod</i> R	5' CAAGGCGAAGCCCCTCAGAT 3'
<i>Hspb7</i> F	5' TCGCCATGACCCCTGACAAT 3'
<i>Hspb7</i> R	5' GGGCCTAAGAGTGTGTGGAG 3'
<i>Klf10</i> F	5' CAGCAAGGGTTACTCCCCAG 3'
<i>Klf10</i> R	5' CACATCCTGGGTGGCTACAG 3'
<i>Myc</i> F	5' AGCCACCTAACTTTTCACCCT 3'
<i>Myc</i> R	5' GCTGTCAAGAATGAGTGTGCC 3'
<i>Noct</i> F	5' TCCGAGTGTGTGCTGTCATC 3'
<i>Noct</i> R	5' GCTACTCATGCCCCTAACGG 3'
<i>Raspsn</i> F	5' TGGGTCCAACACCATGAAGG 3'
<i>Raspsn</i> R	5' AAAGACCGTGGTTGGCTAGG 3'
<i>Thbs</i> F	5' GCAGGTGTGCACTGATGTTG 3'
<i>Thbs</i> R	5' TTCAGAACACACGCTCCGTT 3'

4.7. Análise Estatística

Para a análise dos resultados que obtiveram a distribuição normal, foi empregado o *Teste T de Student*. Para os dados que não obtiveram a distribuição normal, o teste *Mann-Whitney* foi usado para a comparação entre grupos experimentais. Os valores são expressos em média $\pm$ EP (erro padrão) e o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

5. CAPÍTULO I

5.1. Dados anatômicos da prole

Os animais dos grupos restritos apresentaram baixo peso aos 21 e aos 540 dias comparado aos animais dos grupos controles (Figura 7 A e B). Devido ao pequeno tamanho dos animais do grupo restrito aos 21 dias, não foi possível obter o dado de gordura total neste período. Aos 540 dias os animais dos grupos estudados não apresentaram diferenças no peso da gordura total (Figura 8)

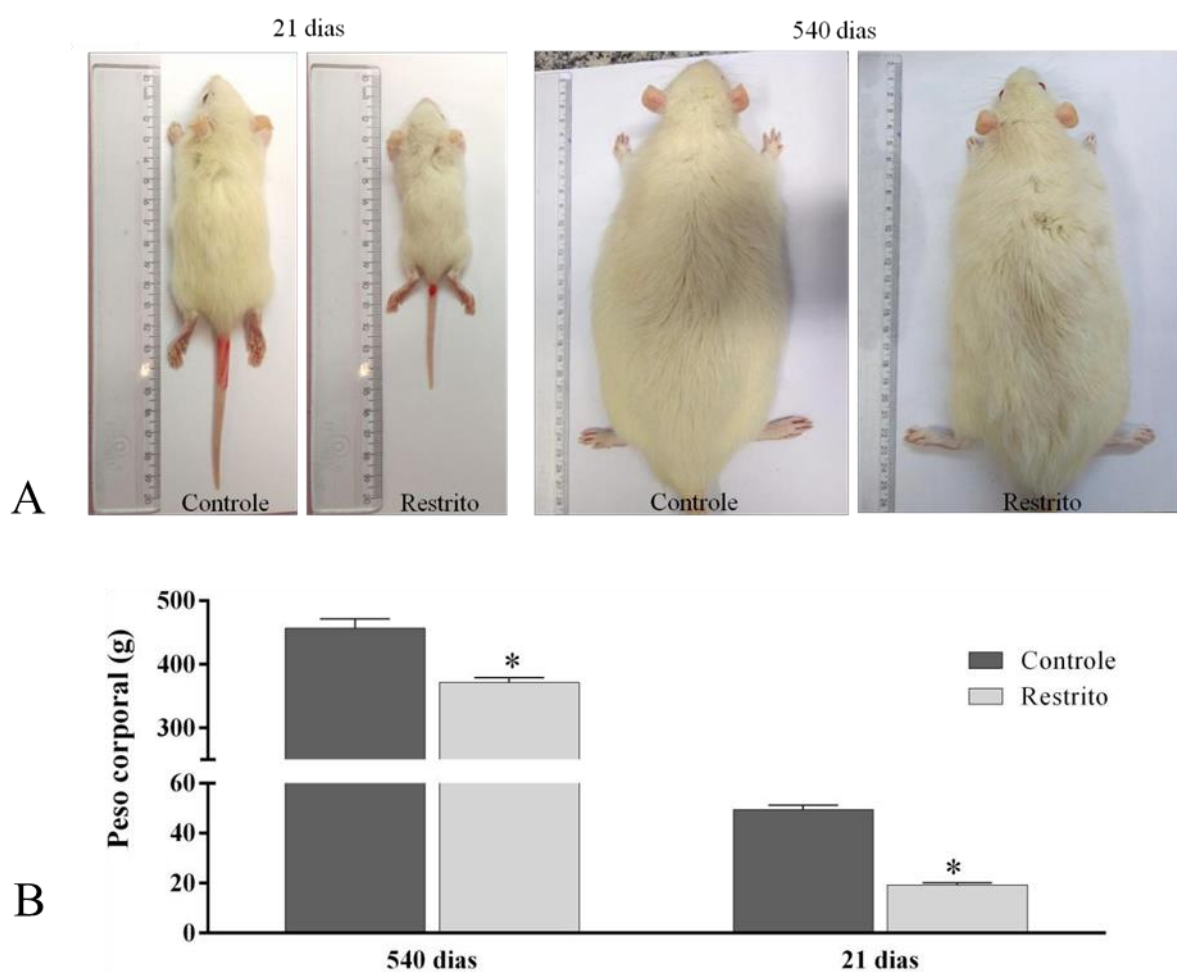


Figura 7. Animais dos grupos controle e restrito aos 21 e 540 dias (**A**). Peso corporal (g) dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 e 540 dias (**B**). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste T.

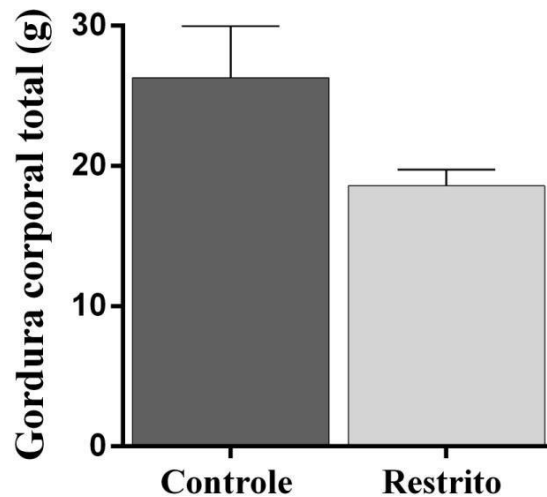


Figura 8. Gordura corporal total dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste T.

5.2. Análises morfológicas

Os músculos SOL e EDL apresentaram morfologia normal. As fibras do músculo SOL dos animais do grupo restrito aos 21 dias, apresentaram tamanho menor, formato mais arredondado comparado com os animais do grupo controle, e em ambos os grupos os núcleos estavam localizados na periferia das fibras (Figuras 9A e B). Não houve diferenças morfológicas nas fibras musculares entre os grupos experimentais aos 540 dias, onde as fibras apresentaram formato poligonal, multinucleadas com núcleos periféricos (Figuras 11A e B e 12A e B). No músculo EDL, o padrão morfológico das fibras foi semelhante aos 21 dias e 540 dias (Figura 10A e B e 12A e B). Os músculos SOL e EDL apresentaram diminuição da AST das fibras, no grupo restrito com 21 dias (Figuras 9C e 10C). Aos 540 dias apenas o músculo SOL do grupo restrito apresentou diminuição da AST comparado ao grupo controle (Figuras 11C e 12C).

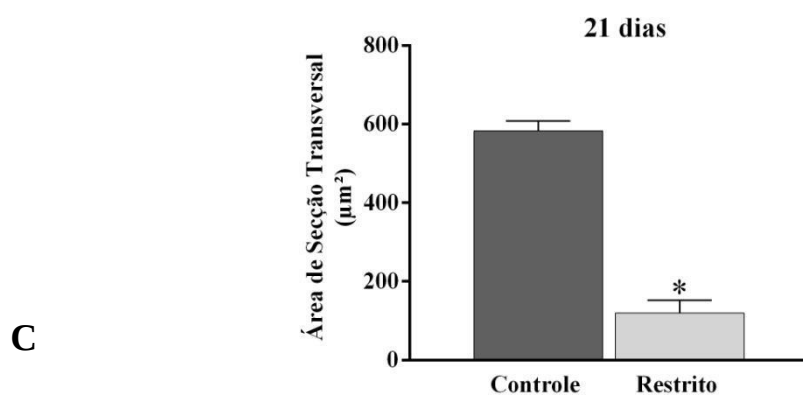
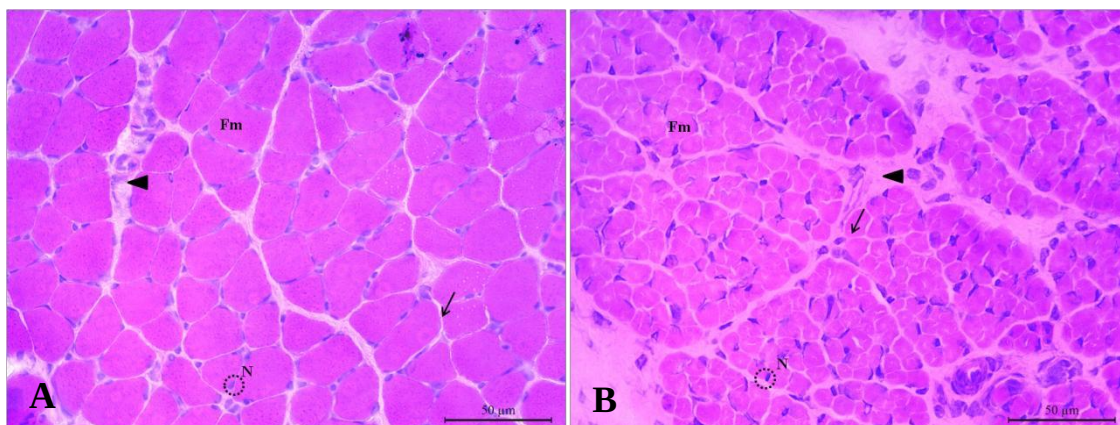


Figura 9. Corte transversal do músculo SOL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Secção Transversal (AST) (µm²) das fibras musculares do músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 (C). Valores expressos em média ± EP, diferença significativa para * p < 0,05. Teste T.

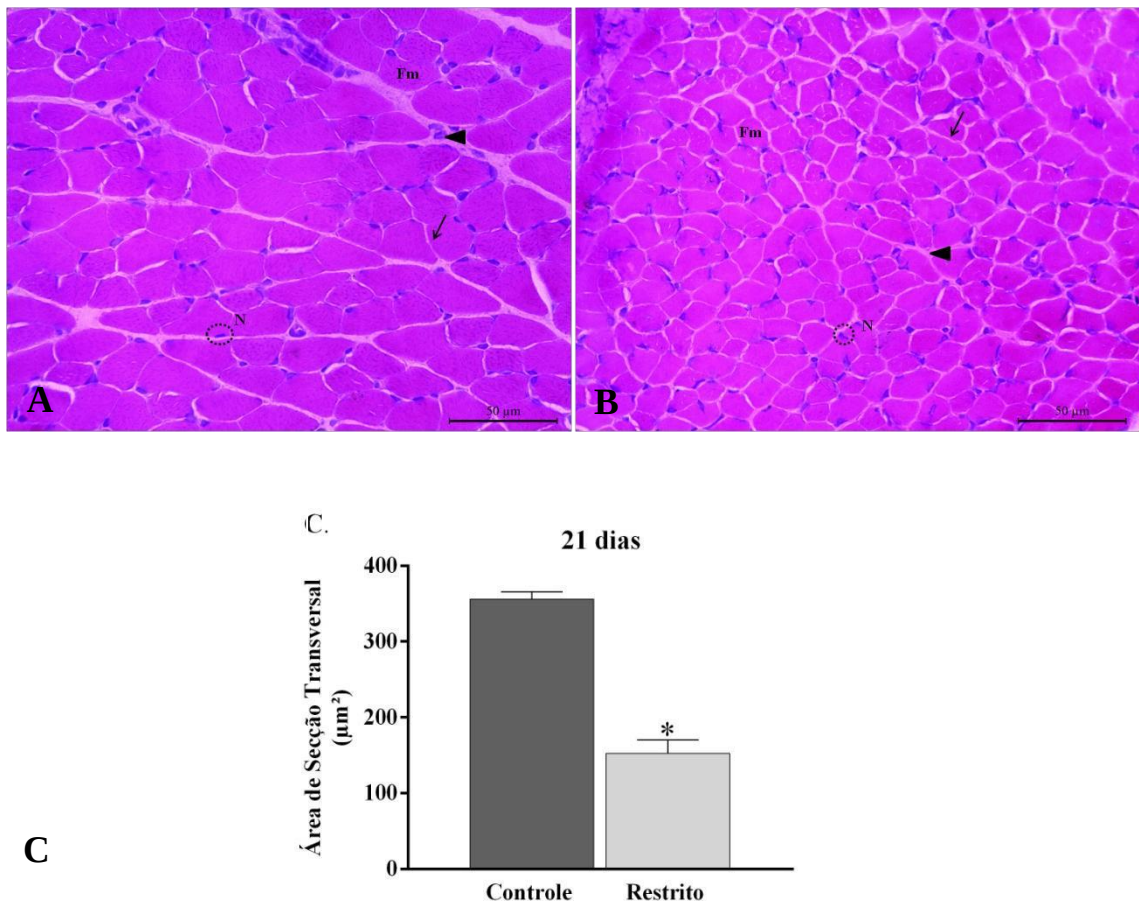


Figura 10. Corte transversal do músculo EDL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). (C) Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste T.

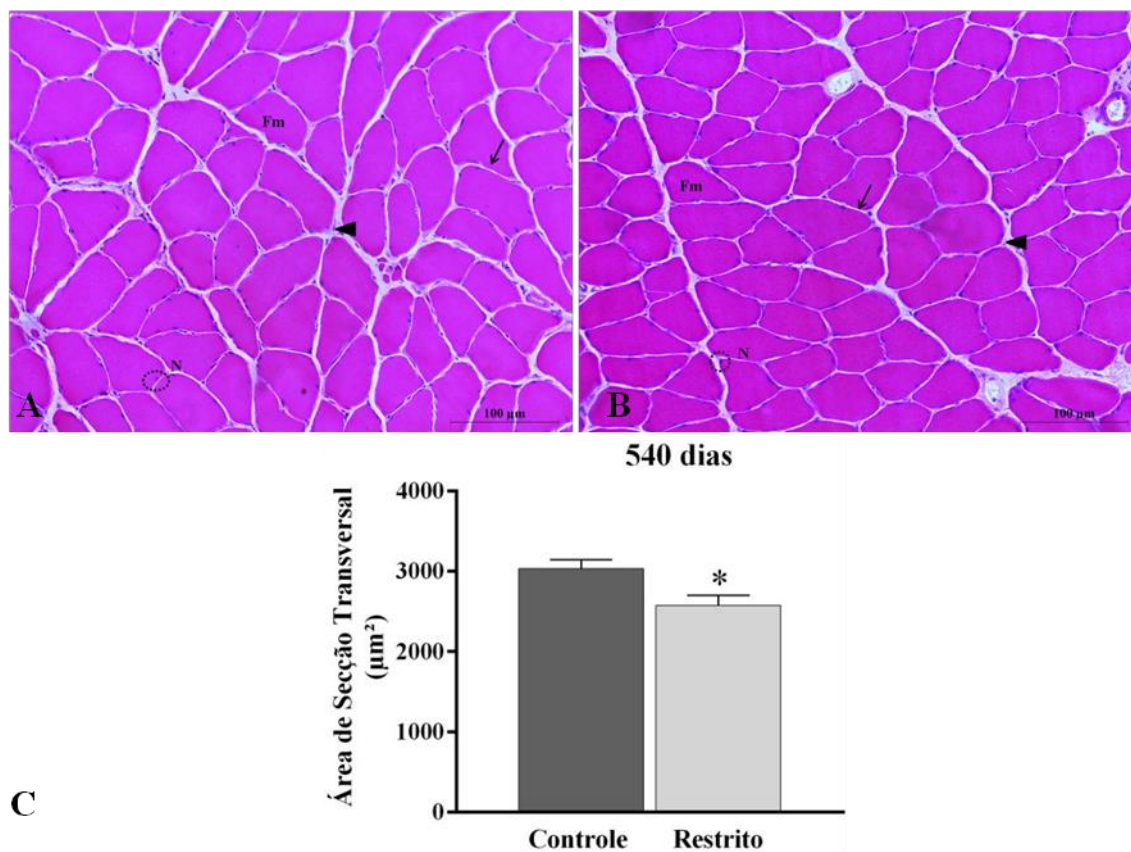


Figura 11. Corte transversal do músculo SOL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Secção Transversal (AST) (μm^2) das fibras musculares do músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias (C). Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para * p < 0,05. Teste T.

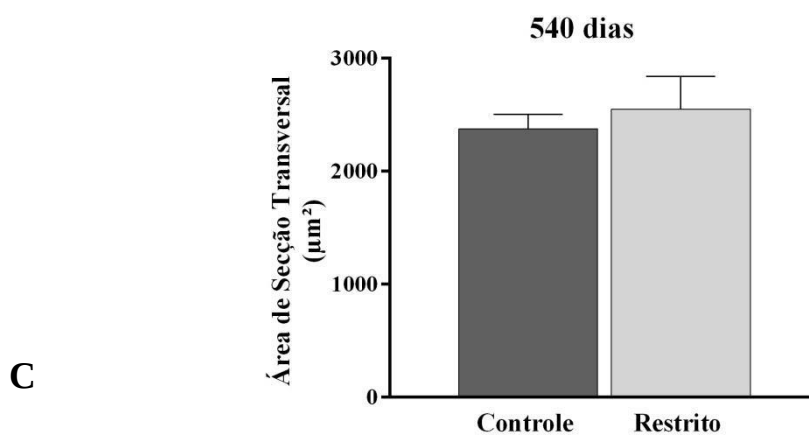
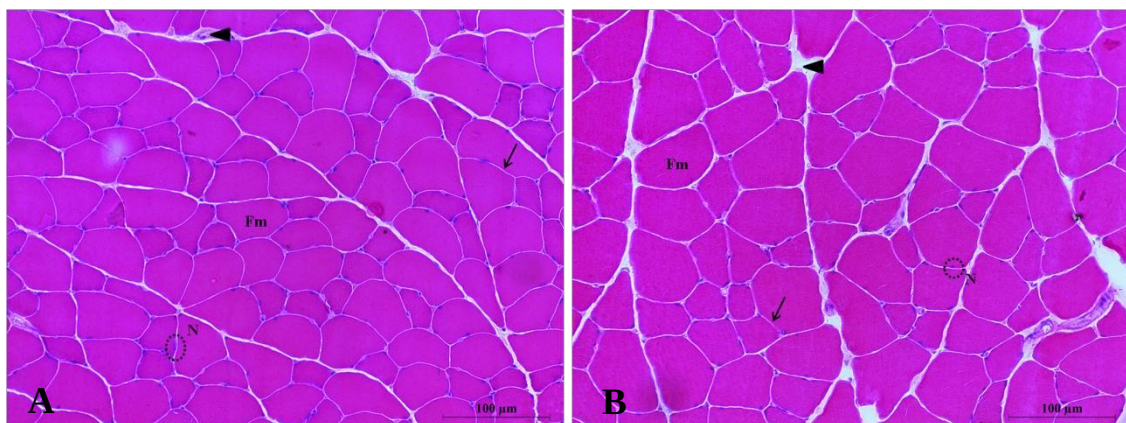


Figura 12. Corte transversal do músculo EDL dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Hematoxilina e Eosina. Fibras musculares (Fm), Núcleos periféricos circulados (N), Endomísio (seta), Perimísio (cabeça de seta). Área de Seção Transversal (AST) (μm²) das fibras musculares do músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 (C). Valores expressos em média ± EP, diferença significativa para * p < 0,05. Teste T.

A reação imunofluorescência mostrou que não houve diferença na frequência tipos de fibras puras (I, IIA, IIB e IIX) dos músculos SOL (Figuras 13 e 15) e EDL (Figuras 14 e 16) aos de 21 e 540 dias.

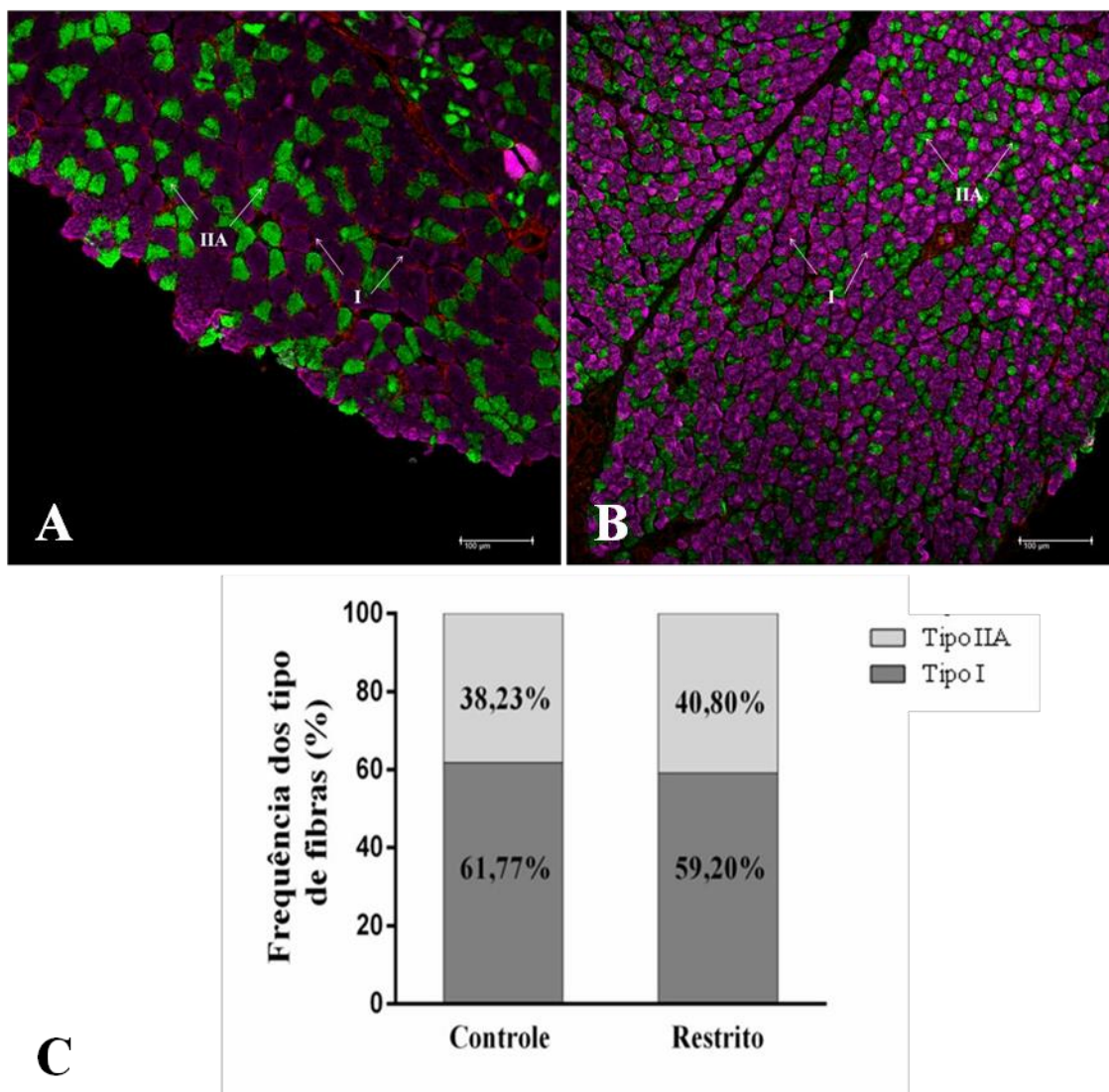


Figura 13. Corte transversal do músculo SOL dos animais dos grupos controle (**A**) e restrito (**B**) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa) e Fibras do tipo IIA (verde). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (**C**) puras no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias . Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

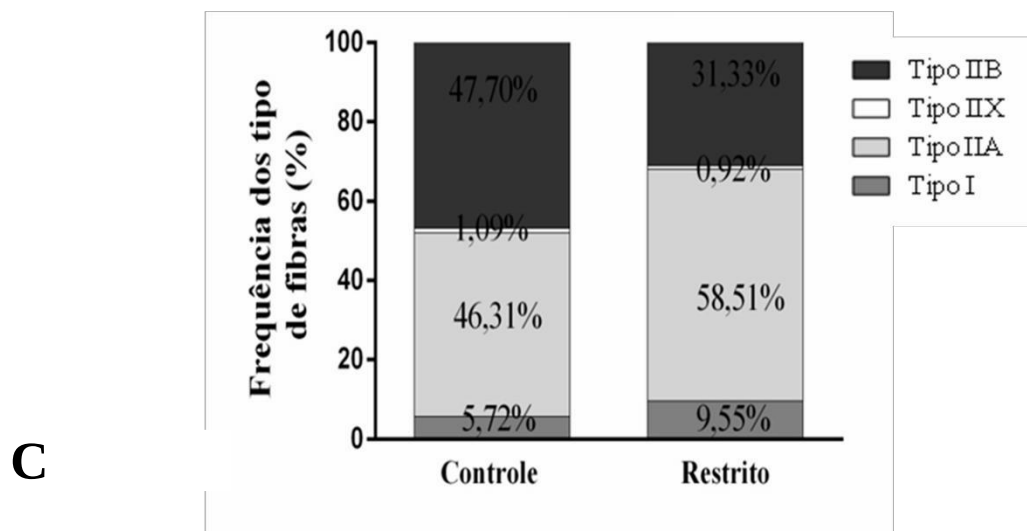
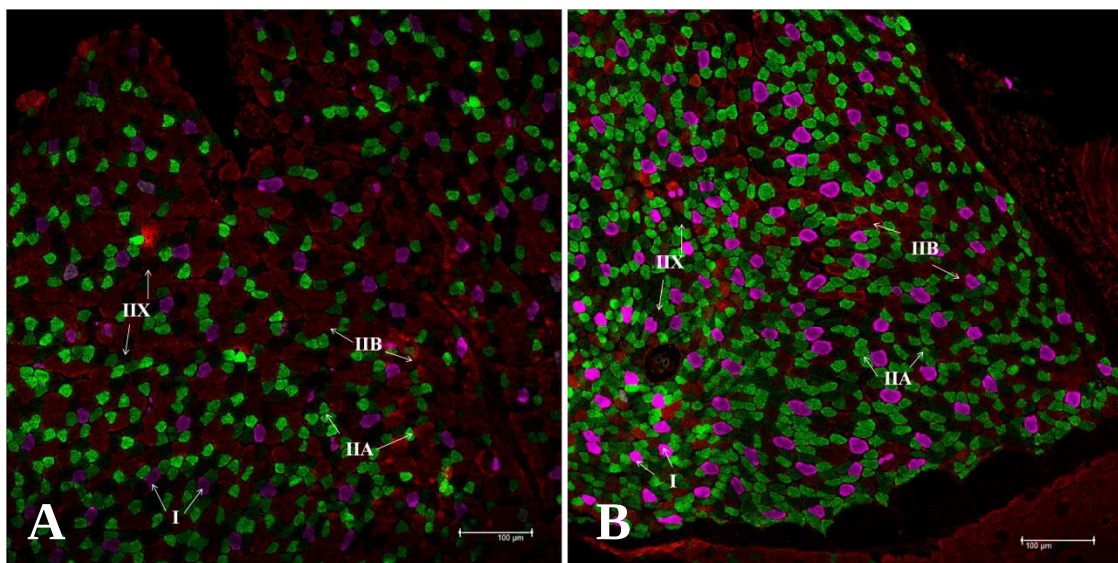


Figura 14. Corte transversal do músculo EDL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) puras no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

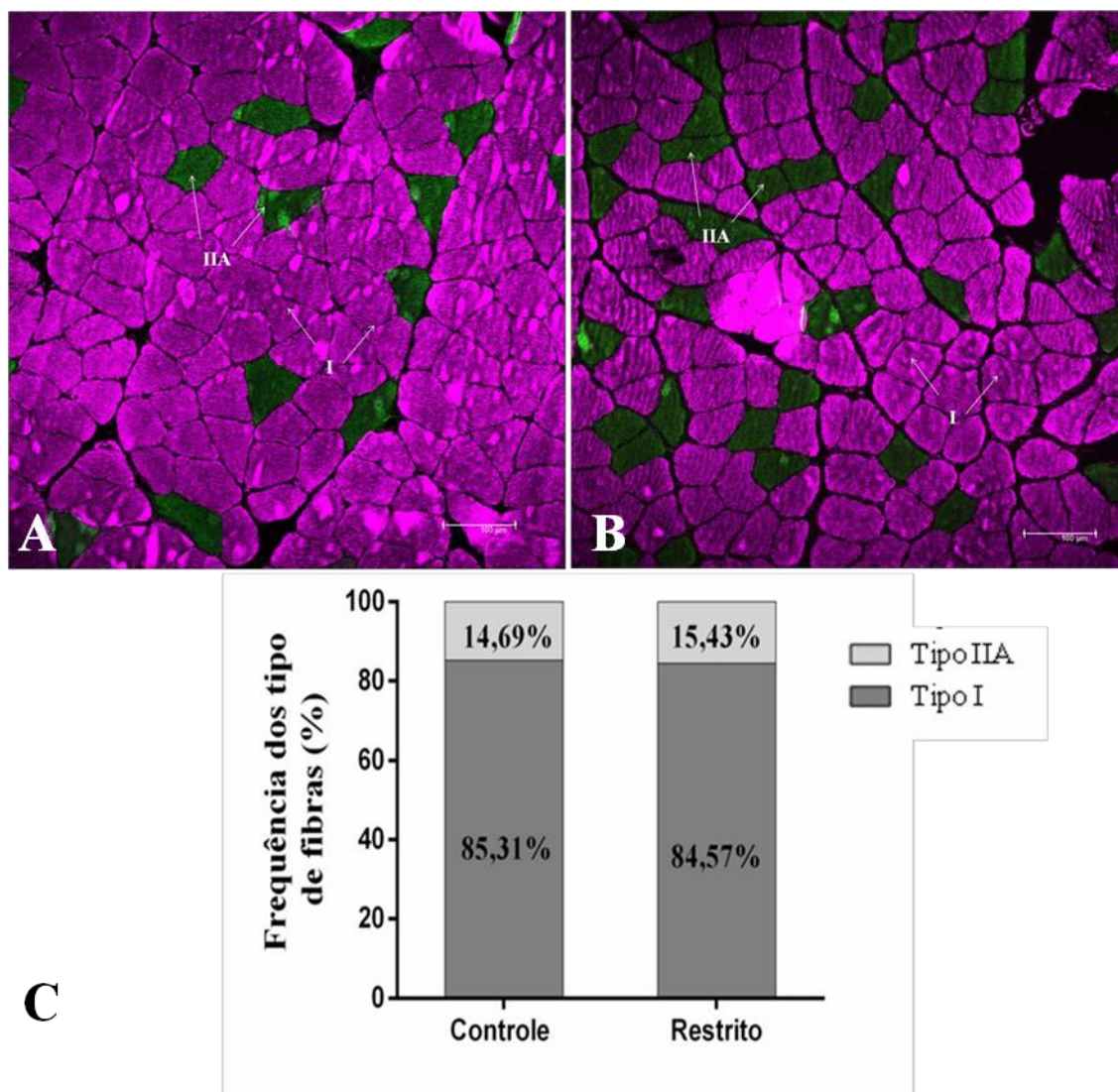


Figura 15. Corte transversal do músculo SOL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 21 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

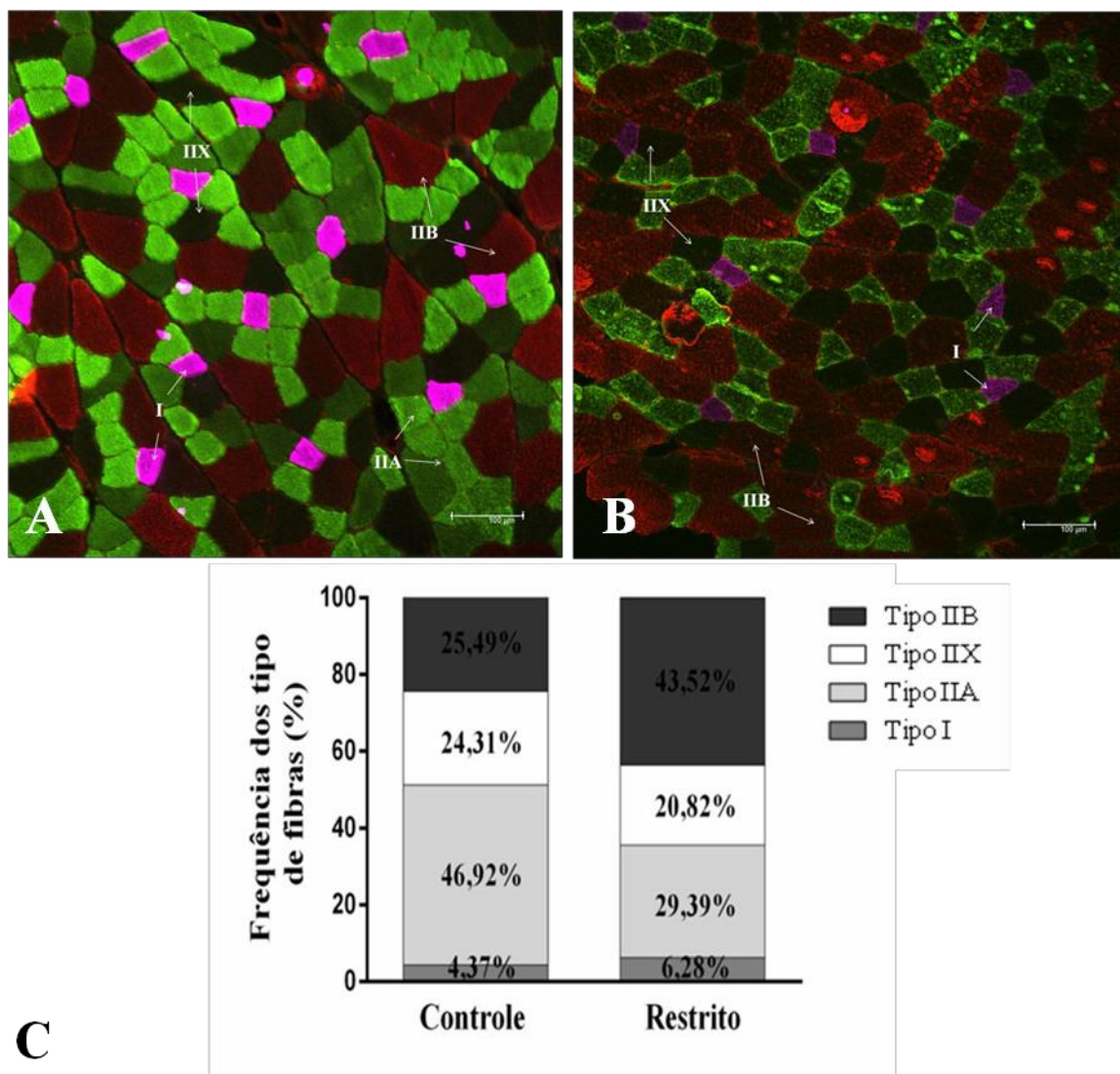


Figura 16. Corte transversal do músculo EDL dos animais dos grupos controle (A) e restrito (B) dos animais aos 540 dias. Fibras do Tipo I (rosa), Fibras do tipo IIA (verde), Fibras do tipo IIX (preto) e Fibras do tipo IIB (vermelho). Imunofluorescência. Frequência (%) dos tipos de fibras musculares (C) puras no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Diferença significativa para * $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

5.3. Análise do transcriptoma

Foram utilizadas 3 amostras dos músculos SOL e EDL, de cada grupo (controle e restrito), dos animais aos 540 dias para a realização do *RNASeq*. Tendo em vista que uma amostra do grupo controle de ambos os músculos foi considerada como *outlier*, apenas duas amostras de cada grupo controle e de cada músculo foi considerada para o restante das análises. Os dados do transcriptoma mostraram o padrão de comportamento de expressão conforme ilustrado pela Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 17).

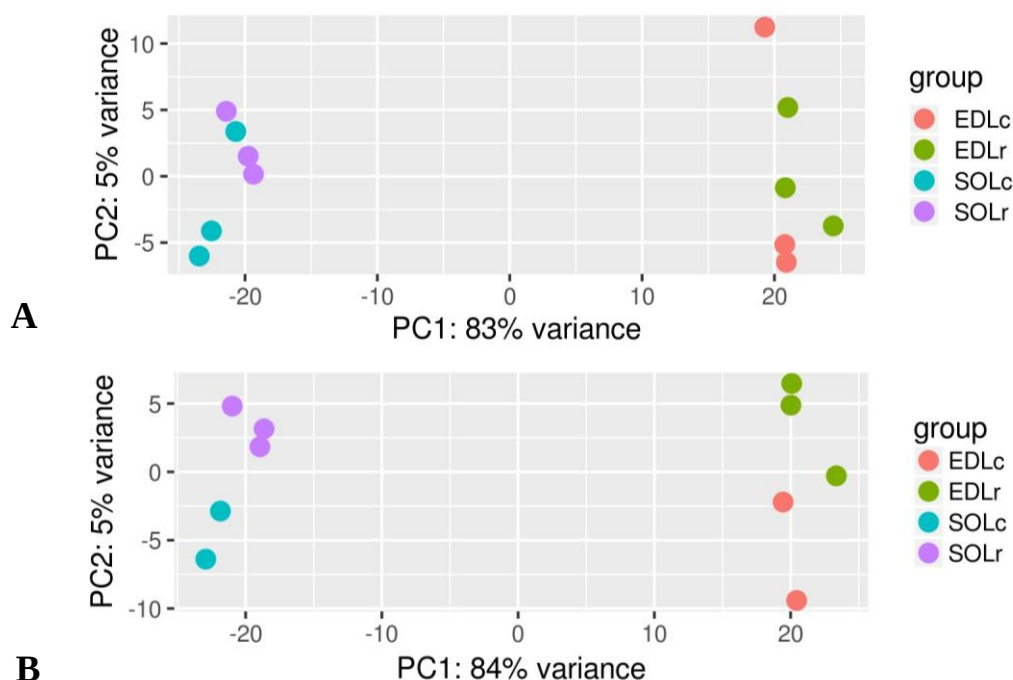


Figura 17. PCA contendo a clusterização das amostras dos músculos SOL e EDL dos animais dos grupos controle (em azul e vermelho) e restrito (em lilas e verde) aos 540 dias. Todas as amostras sequenciadas (**A**). Amostras consideradas para as análises de bioinformática (**B**).

Após a filtragem dos dados e alinhamento com o genoma do organismo *Rattus norvegicus*, disponível na rede, pelos programas *Hisat2* e *featureCounts* respectivamente, obtivemos um total de 24648 genes. Genes contendo uma média de *read-counts* menor que 80 foram descartados, e estabelecemos $\log_2FC \geq 1$ e $p_{adj} \leq 0,05$ como parâmetros para a obtenção dos genes diferencialmente expressos (GDE). Utilizando o pacote R/Bioconductor *DESeq2* foi obtida uma lista com 101 GDE para o músculo SOL, sendo 46 genes *up*- regulados, 45 *down*- regulados (Suplementar 1 e 2), e 10 genes não descritos ainda (9 *up*- regulados e 1 *down*- regulados), e 53 GDE para o músculo EDL, sendo 20 genes *up*-regulados 30 genes *down*- regulados (Suplementar 3 e 4), 3 genes ainda não descritos pela literatura (2 *up*-regulados e 1 *down*-regulados).

Devido aos poucos genes resultantes das análises estatísticas aplicadas ao Transcriptoma, não foi possível, com o auxílio de ferramentas disponíveis na rede (*GeneOntology*, *Keeg*, *Bingo*, *Cytoscape* e *GeneMania*) a obtenção de agrupamentos em processos biológicos, funcionais e metabólicos, ou redes de interações. Portanto, para o estudo mais detalhados dos GDE, utilizamos duas plataformas disponíveis na rede: *GenAge* (<http://genomics.senescence.info/genes/>) e *Geo2R* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

O *GenAge* é um banco de dados utilizado como referência de genes associados ao envelhecimento. Nele é possível acessar listas contendo genes relacionados à longevidade e/ou envelhecimento em organismos modelo como leveduras, vermes, moscas, camundongos e genes homólogos em humanos. O *Geo2R* possibilita a verificação de dados obtidos em tratamentos, períodos e modelos distintos, para possível comparação e estabelecimento de relações entre os diversos estudos já realizados em vários segmentos. Para o nosso estudo foram utilizados os genes dos organismos modelo *Mus musculus* (camundongo) e *Homo sapiens* (humano) obtidos pelo *GenAge*. Com o auxílio do *Geo2R*, selecionamos o artigo *Conserved and species-specific molecular denominators in mammalian skeletal muscle aging*– (código de acesso GSE87107) (Mercken *et al.*, 2017), que lista GDE conservados em organismos modelo envelhecidos, dentre eles, o *Rattus norvegicus*, em diferentes idades (17 e 30 meses). Desta forma obtivemos uma lista contendo genes relacionados à desnutrição proteica perinatal e o envelhecimento, presentes nos músculos SOL e EDL (Tabela 4). A partir dessa lista, selecionamos dois genes *up*-regulados e cinco genes *down*-regulados para validação, com o mesmo padrão de expressão (*up* ou *down*-regulados) entre os músculos SOL e EDL (Tabela 5).

Com o auxílio da plataforma *GeneCards* (www.genecards.org), um banco de dados contendo informações de genes humanos, os GDE selecionados foram inicialmente identificados e sua homologia com o modelo utilizado neste trabalho (*Rattus norvegicus*) confirmada pelo *PubMed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Na sequência, os genes foram classificados nas possíveis funções.

Tabela 4 - Lista final de GDE nos músculos SOL e EDL

Genes	Nomenclatura	Nível de Expressão	Função
<i>Myf1</i>	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>	<i>Up-regulado</i>	Desregulação transcricional do câncer
<i>Chad</i>	<i>Chondroadherin</i>	<i>Up-regulado</i>	Estrutural
<i>Fmod</i>	<i>Fibromodulin</i>	<i>Up-regulado</i>	Estrutural
<i>Ankrd1</i>	<i>Ankyrin Repeat Domain 1</i>	<i>Down-regulado</i>	Liberação - TNF α
<i>Apold1</i>	<i>Apolipoprotein L Domain Containing 1</i>	<i>Down-regulado</i>	Inflamatória
<i>Aqp7</i>	<i>Aquaporin 7</i>	<i>Down-regulado</i>	Metabolismo
<i>Hspb7</i>	<i>Heat Shock Protein Family B (Small) Member 7</i>	<i>Down-regulado</i>	Estrutural
<i>Lrrc30</i>	<i>Leucine Rich Repeat Containing 30</i>	<i>Down-regulado</i>	Sem informações no GeneCards
<i>Klf10</i>	<i>Kruppel Like Factor 10</i>	<i>Down-regulado</i>	Biogênese
<i>Noct</i>	<i>Nocturnin</i>	<i>Down-regulado</i>	Biogênese
<i>Pla1a</i>	<i>Phospholipase A1 Member A</i>	<i>Down-regulado</i>	Metabolismo
<i>Myc</i>	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>	<i>Down-regulado</i>	Biogênese
<i>Sik1</i>	<i>Ilk Inducible Kinase 1</i>	<i>Down-regulado</i>	Ritmos Circadianos

Tabela 5 - Genes selecionados para validação diferencialmente

Vias de Sinalização	Genes
Biogênese	<i>Noct</i> <i>Myc</i> <i>Klf10</i>
Metabolismo	<i>Noct</i> <i>Aqp7</i>
Estrutural	<i>Hspb7</i> <i>Chad</i> <i>Fmod</i>

De acordo com as funções específicas já descritas (*GeneCards*, *PubMed* e literatura), os genes em comum nos músculos SOL e EDL selecionados para validação são genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese – *Noct*, *Myc* e *Klf10* (*down*-regulados), gene relacionado ao metabolismo de lipídeos – *Aqp7* (*down*-regulado), genes estruturais relacionados com a MEC – *Chad* e *Fmod* (*up*-regulados) e o gene relacionado com citoesqueleto – *Hspb7* (*down*-regulado). Além disso selecionamos GDE que se apresentaram *up*-regulados, como *Rapsn*, envolvido com junção neuromuscular, somente no músculo SOL e *Thbs4* envolvido com a MEC, somente no músculo EDL.

5.4. Análises moleculares

5.4.1. Animais com 21 dias

Não foram observadas diferenças na expressão gênica nos músculos SOL e EDL nos animais restritos aos 21 dias, nos marcadores de catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), nos genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), no gene anabólico (*IGF-1*) e no fator de crescimento muscular (Miostatina) (Figuras18 e 19).

Através da análise do Transcriptoma nos animais de 540 dias, genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese – *Noct*, *Myc* e *Klf10*, com o metabolismo de lipídeos – *Aqp7*, genes estruturais relacionados com a MEC – *Chad*, *Fmod* e *Thbs4*, com o

citoesqueleto – *Hspb7*, e a junção neuromuscular – *Raps*, foram selecionados para validação da expressão gênica.

Nos músculos SOL e EDL, observamos aumento na expressão do gene *Aqp7* nos animais do grupo restrito (Figura 20 e 21).

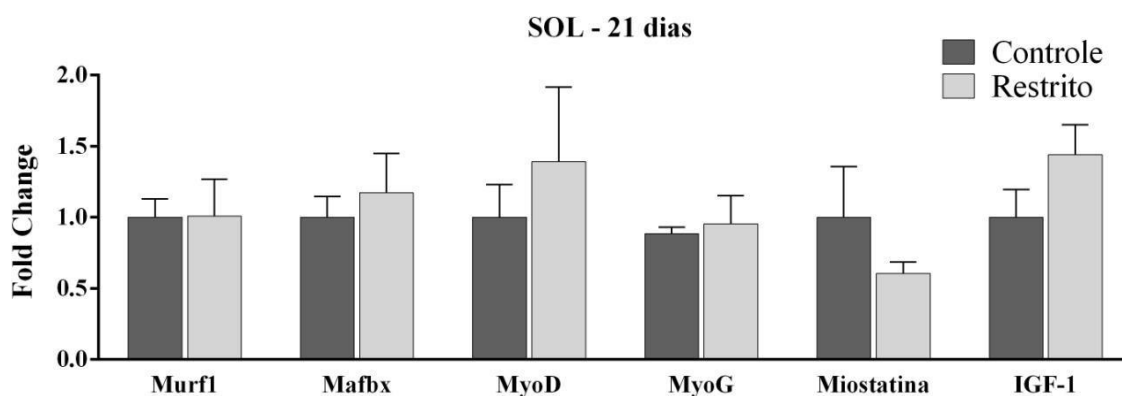


Figura 18. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular *Miostatina* e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

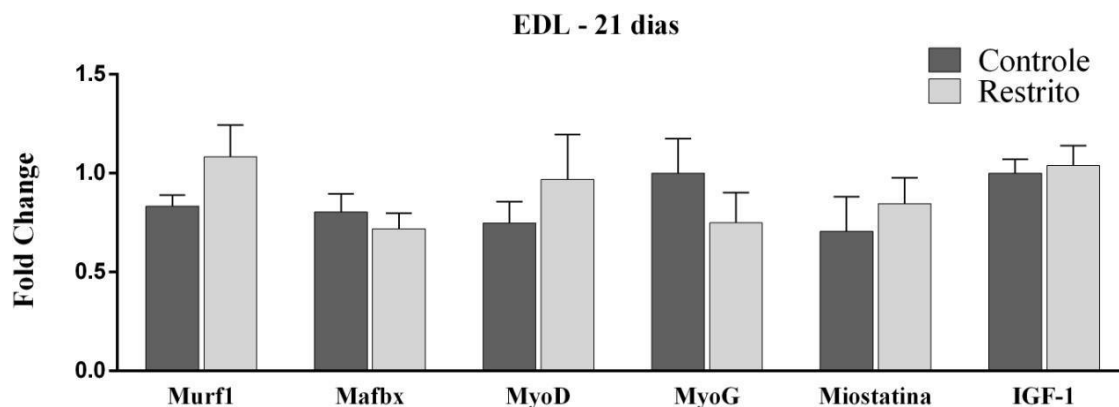


Figura 19. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular *Miostatina* e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

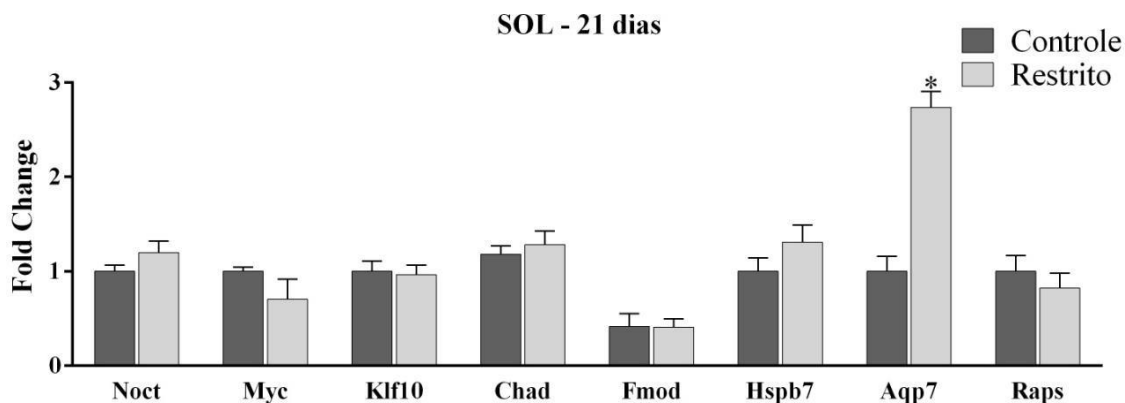


Figura 20. Níveis de Expressão dos genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), e junção neuromuscular (*Raps*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

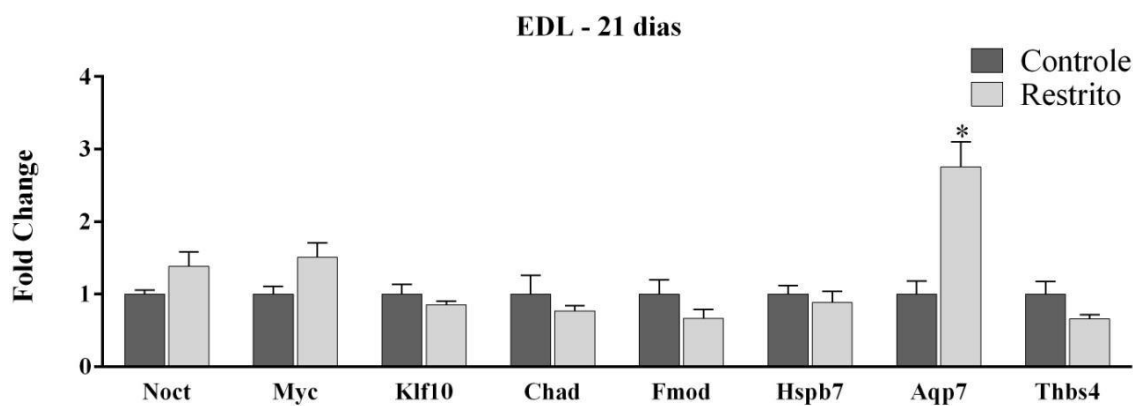


Figura 21. Níveis de Expressão dos genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 21 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

5.4.2. Animais com 540 dias

Aos 540 dias, observamos aumento na expressão do gene *IGF-1* nos animais do grupo restrito somente no músculo SOL (Figura 22). No músculo EDL, apenas o MRF *MyoG* apresentou expressão gênica diminuída nos animais do grupo restrito (Figura 23).

A expressão dos genes validados seguiram o mesmo padrão de expressão (*up/down* – regulados) indicado pela análise do transcriptoma.

No músculo SOL, observamos aumento na expressão dos genes *Chad*, *Fmod* e *Raps*, e diminuição na expressão do gene *Hspb7* nos animais do grupo restrito (Figura 24). No músculo EDL, apenas a *Chad* apresentou aumento na expressão gênica nos animais do grupo restrito (Figura 25).

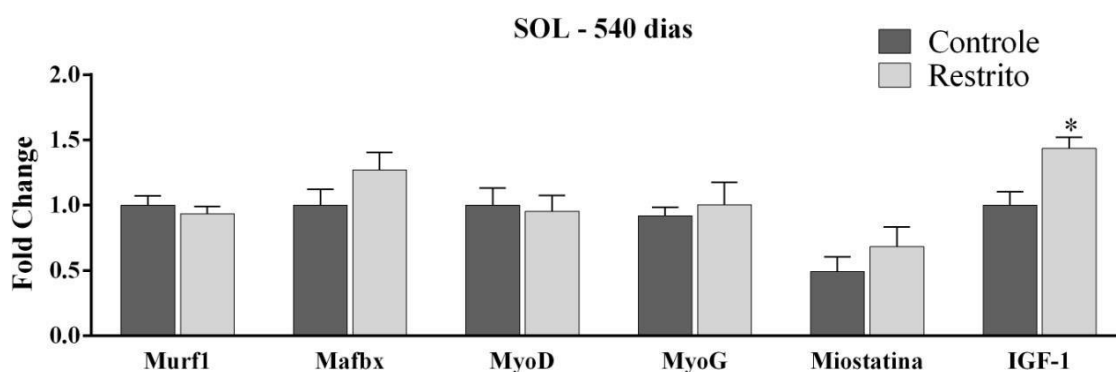


Figura 22. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

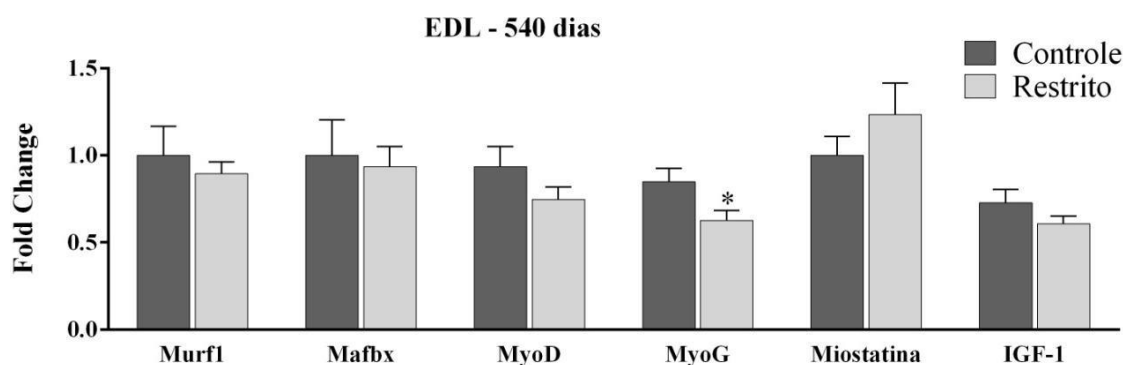


Figura 23. Níveis de Expressão dos genes relacionados do catabolismo (*Murf1* e *MAFBx*), genes miogênicos (*MyoD* e *MyoG*), do fator de crescimento muscular Miostatina e do gene anabólico (*IGF-1*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

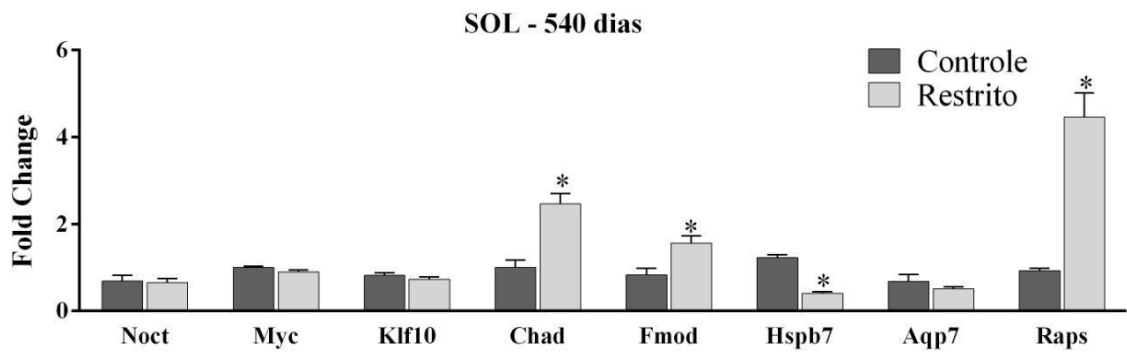


Figura 24. Níveis de Expressão dos genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad* e *Fmod*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), e junção neuromuscular (*Raps*), no músculo SOL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

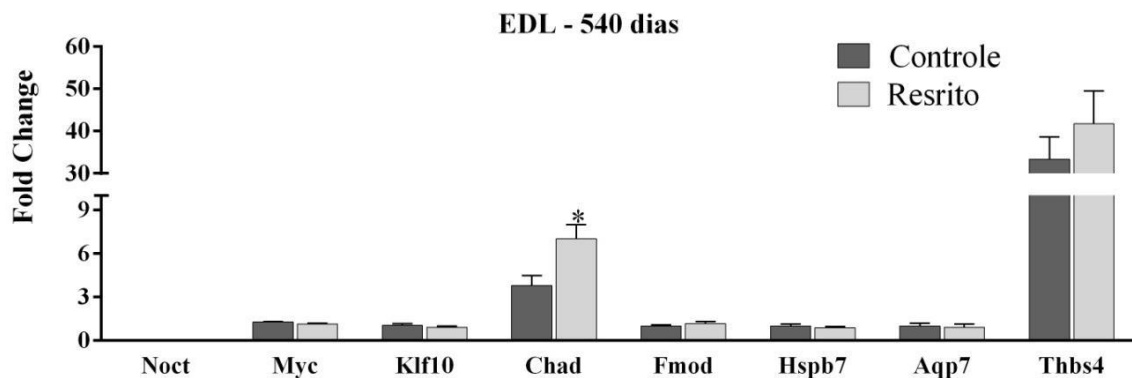


Figura 25. Níveis de Expressão dos genes envolvidos com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*), a matriz extracelular (*Chad*, *Fmod* e *Thbs4*), o citoesqueleto (*Hspb7*), o metabolismo de lipídeos (*Aqp7*), no músculo EDL dos animais dos grupos controle e restrito aos 540 dias. Valores expressos em média $\pm$ EP, diferença significativa para $p < 0,05$. Teste *Mann-Whitney*.

5.4.3. Resumo dos Resultados

		Dados				Justificativas
		SOL 21 dias	SOL 540 dias	EDL 21 dias	EDL 540 dias	
	Peso Corporal	↓	↓	↓	↓	Baixo peso corporal não recuperado
	AST	↓	↓	↓		Hipotrofia muscular
	Tipo e Fibras %					
<i>Murf1</i> e <i>MAFBx</i>	Genes Catabolismo					
<i>MyoD</i> e <i>MyoG</i>	Genes Miogênicos				<i>MyoG</i> ↓	Manutenção do fenótipo glicolítico
<i>IGF-1</i> e <i>Miostatina</i>	Genes Crescimento		<i>IGF-1</i> ↑			Amenizar a perda de massa muscular com síntese proteica basal e regulação dos atrogenes
<i>Noct</i> , <i>Myc</i> e <i>Klf10</i>	Genes Biogênese		↓		↓	Hipotrofia muscular
<i>Aqp7</i>	Gene Metabolismo Lipídeos	↑	↓	↑	↓	Proteção muscular das alterações resultantes da restrição proteica perinatal (obesidade, resistência a insulina e diabetes tipo II)
<i>Fmod</i> e <i>Chad</i>	Genes da MEC		↑		↑	Manutenção a integridade dos componetes da MEC
<i>Hspb7</i>	Gene do Citoesqueleto		↓		↓	Alteração nas fibras musculares, alterando a integridade do sarcômero
<i>Rapsn</i> e <i>Tbhs7</i>	Genes Específicos		<i>Rapsn</i> ↑		<i>Tbhs7</i> ↑	Aparentemente SOL sem danos na JNM e EDL com o sarcolema mais integro

6. CAPÍTULO II

Os primeiros estudos sobre programação fetal avaliaram a relação do baixo peso ao nascimento, de indivíduos que apresentavam determinadas doenças na vida adulta (BARKER; OSMOND; LAW, 1989; BEAUCHAMP; HARPER, 2016). Barker, Osmond e Law, (1989), correlacionaram a morte por doenças coronarianas de indivíduos que nasceram entre 1911 e 1930, com o baixo peso ao nascimento, observando que as taxas de mortalidade aumentavam conforme o peso dos recém nascidos diminuía (4,310Kg até 2,500Kg). O baixo crescimento fetal durante o período intrauterino pode estar associado com o desenvolvimento de doenças como obesidade, diabetes do tipo II, doenças cardiovasculares, bem como alterações musculares (OZANNE; HALES, 1999; BATTISTA et al., 2002; BAYOL et al., 2004; CHEEMA et al., 2005; ZHU et al., 2006; ZOHDI et al., 2013; SHARPLES; STEWART; SEABORNE, 2016). Esse processo pode ocorrer devido à baixa ingestão alimentar materna, pela ingestão insuficiente da quantidade de alimentos, de micro/macronutrientes essenciais, ou ainda uma restrição calórica (BEAUCHAMP; HARPER, 2016).

No nosso estudo, observamos que os animais que sofreram uma restrição proteica perinatal apresentaram menor peso ao desmame (21 dias), quando comparados aos animais controles, assim como na senilidade (540 dias), enquanto a gordura corporal total dos animais senis não apresentou alterações. Santos et al., (2018), utilizando o mesmo modelo experimental deste estudo (restrição materna proteica – 6% durante a gestação e a lactação) para analisar os efeitos da restrição proteica sob a próstata, observaram que após 40 dias de nascidos os animais do grupo restrito apresentavam um ganho rápido de peso, persistindo até 360 dias; porém aos 540 dias o peso corporal dos animais restritos durante toda a gestação e lactação, se encontravam baixos novamente. No entanto, Confortim et al., (2015), observaram que aos 365 dias, ratos provenientes de mães também alimentadas com uma dieta hipoproteica (6%) durante toda a gestação e lactação, diminuíram em 19% o peso corporal. Os dados desses estudos demonstram que a restrição proteica durante as fases iniciais de desenvolvimento do animal pode interferir na manutenção do peso corporal durante as diferentes fases de desenvolvimento; embora um crescimento acelerado possa ser constatado após a normalização da disponibilidade de proteínas na juventude, observa-se que houve diminuição do peso corporal durante a senilidade, como observado no nosso estudo.

Nossos dados demonstram também que, a restrição proteica no período perinatal resultou no atraso no desenvolvimento muscular (hipotrofia muscular), conforme observado pela menor AST das fibras nos músculos SOL e EDL aos 21 dias, nos animais do grupo restrito.

Segundo alguns autores, a restrição proteica no perinatal pode ocasionar o redirecionamento da energia obtida pela nutrição, escassa em proteínas, priorizando o desenvolvimento de órgãos-chaves (cérebro e coração); como aproximadamente 85% do volume da fibra muscular é composto por proteínas, componente reduzido na dieta, isso pode ter influenciado o atraso no desenvolvimento e crescimento muscular nos estágios iniciais (HOPPELER, 1986; RUIZ-ROSADO et al., 2013; SYMEON et al., 2015; SHARPLES; STEWART; SEABORNE, 2016).

A disponibilização de nutrientes (ração com 17% de proteína) após o desmame (21 dias), durante todo o período do experimento (540 dias), possibilitou a recuperação da AST das fibras musculares no músculo EDL, enquanto no músculo SOL, a recuperação da AST das fibras musculares não foi evidenciada. Como o músculo EDL, que apresenta metabolismo glicolítico e contração rápida, é utilizado na realização de movimentos bruscos e de explosão (JOHNSTON, 1985; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011; SCHIAFFINO et al., 2013), é possível que durante a senilidade este músculo seja pouco exigido, fato que pode ter favorecido a recuperação da AST. Já, o músculo SOL, que possui metabolismo oxidativo e contração lenta, é um músculo postural (JOHNSTON, 1985; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011; SCHIAFFINO et al., 2013), sendo mais exigido e, possivelmente esse fato pode ter comprometido a recuperação da AST muscular nos animais submetidos à restrição proteica materna durante a gestação e lactação. Cabeço et al., (2012), também observaram que, animais com 30 e 112 dias, provenientes de mães submetidas à restrição proteica (6%) durante a gestação, apresentaram uma menor AST no músculo SOL em ambas as idades, sugerindo que a restrição proteica materna durante este período promoveu um atraso no desenvolvimento desse músculo (hipotrofia), mesmo com a realimentação adequada imposta após o nascimento. Confortim et al., (2015), também encontraram uma redução na AST das fibras do músculo SOL nos animais senis (365 dias), submetidos à restrição proteica materna (6%) durante a gestação e lactação. Esses resultados corroboram os nossos resultados obtidos nos animais senis (540 dias) e são um indicativo que a restrição proteica no período perinatal acentua o processo de sarcopenia.

No nosso estudo, a frequência dos tipos de fibras dos músculos SOL e EDL não apresentou alteração no grupo restrito em comparação ao grupo controle nos períodos analisados (21 e 540 dias). As pesquisas têm demonstrado discrepâncias em relação aos resultados referentes à modulação dos tipos de fibras em animais submetidos à restrição proteica perinatal. Confortim et al., (2015), utilizando o mesmo modelo utilizado no nosso experimento, também não observaram alteração na frequência dos tipos de fibras no músculo SOL da prole do grupo restrito, aos 365 dias. Ruiz-Rosado et al., (2013), observaram um aumento na frequência das fibras do tipo IIA e IIX, juntamente com a diminuição das fibras IIB

no músculo EDL de ratos com 15 a 54 dias, submetidos a uma privação crônica alimentar (50% a menos de ingestão alimentar durante toda a gestação e lactação). Cabeço et al., (2012), encontraram um aumento na frequência de fibras do tipo IIB e uma diminuição das fibras tipo I e IIA+IIX no músculo EDL, na prole de 30 dias quando as genitoras foram submetidas a uma restrição proteica (6%) durante a gestação.

As divergências encontradas na literatura, relacionadas às mudanças na frequência dos tipos de fibras, podem ser decorrentes do uso de diferentes protocolos envolvendo programação fetal, do tipo e grau da dieta utilizada (podendo ser restrição – calórica ou proteica, dieta *high fat*; leve ou severa), do período e tempo de exposição (podendo ser durante os períodos iniciais, tardios, ou durante toda a gestação, envolvendo ou não o período da lactação), do tempo de utilização da dieta normoproteica e também da fase de desenvolvimento/crescimento do animal (ZHU, et al., 2004; MALLINSON et al., 2007; CABEÇO, et al., 2012; RUIZ-ROSADO et al., 2013; CONFORTIM, et al., 2015; PILEGGI; et al., 2016). Outros fatores relacionados com a programação fetal também podem causar discrepâncias nos resultados, como alterações na função placentária e trocas endócrinas, o que pode ser influenciável pelo número e posição de filhotes de cada gestação, possivelmente alterando a taxa de animais que são programados durante a gestação (VAISERMAN, 2015; RINALDI, et al., 2018).

No presente estudo, especulamos que os animais senis, os quais após o desmame receberam ração com 17% de proteína, tenham se adaptado à condição de restrição proteica perinatal, tendo em vista que, de forma geral, os músculos mantiveram seu fenótipo, embora o peso dos animais do grupo restrito tenha sido menor comparado ao grupo controle, nos períodos analisados. Porém, o músculo SOL, utilizado para a realização de movimentos de sustentação (JOHNSTON, 1985), foi o mais acometido pela restrição proteica materna perinatal, demonstrando diminuição na AST das fibras. Já, o músculo EDL, que possui metabolismo glicolítico e é mais suscetível à fadiga, sendo recrutado nas atividades mais bruscas (JOHNSTON, 1985), possivelmente foi mais poupado durante a condição estudada.

A diminuição da AST das fibras no músculo SOL no grupo restrito, aos 21 e 540 dias é um indicativo do retardo no desenvolvimento muscular nos estágios iniciais e/ou do aumento do catabolismo muscular. O processo de desenvolvimento e crescimento muscular envolve fatores que controlam a proliferação e a diferenciação das células precursoras miogênicas (células satélites), como os fatores reguladores miogênicos (MRFs), além do balanço entre as taxas de síntese e degradação proteica (MEGENEY; RUDNICKI, 1995; MURGIA et al., 2000; BODINE et al., 2001; SARTORELLI; FULCO, 2004). O processo de degradação proteica (catabolismo muscular), pode ocorrer pela ativação de dois principais sistemas: o

sistema autofágico – lisossomal e o sistema ubiquitina – proteossoma (UPS) (BODINE et al., 2001; SACHECK et al., 2007; SANDRI, 2010; SCHIAFFINO et al., 2013). A ativação do sistema UPS é dependente da ubiquitina – ligase E3, destacando-se o *Murf1* (Muscle Ring Finger protein-1) e o *MAFbx* (Muscle Atrophy F-box ou atrogin) (COHEN; NATHAN; GOLDBERG, 2015). Outro importante regulador da massa muscular é o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*IGF-1*), que atua na modulação da taxa de síntese e degradação proteica muscular, estimula a hipertrofia no músculo, influencia a composição dos tipos de fibras, além de estar envolvido com o aumento da produção de força (MURGIA et al., 2000; BODINE et al., 2001; SARTORELLI; FULCO, 2004).

No nosso estudo, embora os animais do grupo restrito tenham apresentado uma hipotrofia muscular com 21 dias em ambos os músculos estudados (SOL e EDL), não observamos alterações na expressão dos genes miogênicos (MRFs) (*MyoD* e *MyoG*), do gene anabólico (*IGF-1*), dos genes catabólicos (*Murf1* e *MAFBx*) e do fator de crescimento Miostatina. Semelhante aos nossos resultados, Cabeço et al., (2012) também não observaram alterações nos MRFs *MyoD* e *MyoG* nos músculos SOL e EDL de ratos jovens (30 dias) e adultos (112 dias) submetidos a restrição proteica (6%) durante a gestação. No presente experimento, é possível que, embora os músculos SOL e EDL tenham mostrado menor AST no grupo restrito aos 21 dias, essa condição não esteja diretamente relacionada com alterações nos genes avaliados. A condição hipotrófica dos músculos pode ser decorrente de alterações de genes de outras vias de sinalização que controlam o fenótipo da fibra muscular e genes da matriz extracelular.

Na senilidade (540 dias), observamos diminuição na expressão gênica da *MyoG* no músculo EDL e o aumento na expressão do *IGF-1* no músculo SOL. Além da miogênese, os MRFs *MyoD* e *MyoG* estão envolvidos com a manutenção do fenótipo rápido e lento dos músculos, respectivamente (HUGHES et al., 1993; SEWARD et al., 2001; SHARPLES et al., 2015). De fato, Hughes et al., (1999), demonstraram que a superexpressão da *MyoG* está relacionada com alterações no metabolismo das fibras do músculo EDL, tornando-as mais oxidativas. Seward et al., (2001), mostraram que a falta de expressão da *MyoD* altera os níveis proteicos do MHC no tecido muscular, sendo necessária para a expressão do MHC IIB. No envelhecimento, ocorre uma mudança no metabolismo das fibras musculares, com tendência de aumento das fibras oxidativas comparadas às glicolíticas (CACCIA; HARRIS; JOHNSON, 1979). Caccia et al., 1979, realizaram análises descritivas da morfologia e fisiologia dos músculos SOL e EDL utilizando ratos jovens, adultos e senis. Os autores observaram um aumento na proporção das fibras oxidativas lentas e redução nas fibras glicolíticas rápidas no

músculo EDL dos animais senis quando comparados aos animais juvenis e adultos. No nosso caso, a diminuição na expressão da *MyoG* pode indicar um mecanismo de manutenção do fenótipo metabólico glicolítico do músculo EDL, tendo em vista que, durante o envelhecimento é comumente observado uma tendência de modulação no metabolismo muscular, de glicolítico para oxidativo (CACCIA; HARRIS; JOHNSON, 1979; CABEÇO et al., 2012;).

O aumento na expressão do *IGF-1* no músculo SOL dos animais do grupo restrito senil sugere uma possível tentativa de atenuar a perda de massa muscular observada pela AST diminuída nesse grupo. De Paula et al., (2017), analisando juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a um período de jejum (por 10 dias) e realimentação (60 horas) observaram que durante o período de jejum, quando ocorreu aumento do catabolismo, houve também aumento na expressão do *IGF-1*, no tecido muscular. Segundo os autores, o aumento na expressão dos genes relacionados ao anabolismo durante a condição catabólica, possivelmente foi uma adaptação fisiológica em resposta ao catabolismo, na qual aminoácidos provenientes da degradação muscular podem ser importantes para a manutenção da síntese proteica basal no músculo dos animais. Assim, acreditamos que, na condição estudada, embora o músculo SOL, na senilidade, não tenha demonstrado aumento na expressão dos genes catabólicos (*Murf1* e *MAFBx*), o aumento na expressão do *IGF-1* sugere um incremento na atividade de síntese de proteínas, possivelmente relacionadas com a manutenção da função e atividade desse músculo.

Ferramentas computacionais como suporte para análises biológicas têm sido amplamente utilizadas com a finalidade de avaliar dados mais abrangentes (BINNECK, 2004). Essas análises possibilitam a melhor compreensão das alterações moleculares resultantes de determinado tratamento, patologias ou condição fisiológica específica (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010; YANG; KIM, 2015; DENG et al., 2017).

Mercken et al., (2017), utilizaram a análise do transcriptoma dos músculos gastrocnêmio e vasto lateral em diferentes espécies (camundongos, ratos, macacos e humanos) e diferentes fases de crescimento (jovens, adultos e idosos), para a obtenção de genes conservados envolvidos com a senilidade. Os autores demonstraram que a complexidade das vias de sinalização envolvidas com a senilidade aumentavam de acordo com a evolução das espécies (camundongos para humanos), sendo as vias do metabolismo energético, diabetes, resposta imune e síntese proteica, as mais acometidas.

No nosso estudo, a análise do transcriptoma dos músculos SOL e EDL dos animais senis identificou um número distinto de genes diferencialmente expressos (GDE) no grupo restrito, nos dois tipos musculares analisados (101 GDE no SOL e 53 GDE no EDL) sendo que, alguns

apresentaram o mesmo padrão de comportamento entre os músculos. No músculo SOL, 46 genes se encontravam *up*-regulados, 45 *down*-regulados e 10 genes ainda não foram descritos pela literatura, enquanto no músculo EDL, 20 genes se encontravam *up*-regulados, 30 genes *down*-regulados e 3 genes ainda não foram descritos pela literatura. Do total de GDE, 7 genes estavam presentes em ambos os músculos apresentando mesmo padrão de expressão (*up* e *down* regulados), sendo assim selecionados para validação. Esses genes estão relacionados com a proliferação e diferenciação durante a embriogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10* – *down*-regulados), com o metabolismo de lipídeos (*Aqp7* – *down*-regulado), estruturação da MEC (*Chad* e *Fmod* – *up*-regulados), e com o citoesqueleto (*Hspb7* – *down*-regulado). Dois GDE – *Rapsn* e *Tbhs7*, *up*-regulados nos músculos SOL e EDL respectivamente, também foram selecionados para validação. Esse padrão de expressão dos GDE demonstra a plasticidade muscular envolvida com a manutenção do fenótipo muscular em condições como a avaliada no presente estudo (MCKINNELL; RUDNICK, 2004).

Embora a comparação da expressão de genes por *RT-qPCR* utilizando *RNASeq* como base seja possível e amplamente utilizada, estudos demonstram que a taxa de validação não é totalmente compatível com o apontado pelo Transcriptoma (EVERAERT., et al, 2016; TENG., et al. 2016). Todos os genes validados no nosso estudo, apresentaram o mesmo padrão de expressão (*up/down*-regulado) encontrado no Transcriptoma porém, no músculo SOL, apenas os genes relacionados com a estrutura celular – *Chad*, *Fmod* e *Hspb7*, e junção neuromuscular – *Raps*, apresentaram diferença estatística; no músculo EDL, apenas o gene *Chad* foi estatisticamente significativo entre os grupos. Ainda que poucas alterações moleculares tenham sido observadas durante o envelhecimento, derivadas da restrição proteica perinatal, o número de réplicas utilizadas para a realização do Transcriptoma pode ter influenciado na obtenção da lista de genes viáveis para a análise, bem como a escolha dos parâmetros para a obtenção dos GDE ($\log_2FC \geq 1$ e $padj \leq 0,05$) (LIU; ZHOU; WHITE, 2014).

Entre os GDE na análise do transcriptoma no músculo SOL, destacamos o *Forkhead Box O1* (*Foxo1*), que apresentou-se *down*-regulado, e está envolvido com o metabolismo energético, estresse oxidativo, anabolismo e catabolismo muscular, durante a manutenção do fenótipo em resposta a fatores hormonais, estressores e nutricionais (OGG et al., 1997; KOPS et al., 2002; ALLEN; UNTERMAN, 2007; KITAMURA et al., 2007; SANCHEZ; CANDAU; BERNARDI, 2014). *Foxo1* regula os dois principais sistemas de degradação proteica de maneiras distintas; no sistema autofágico/ lisossomal é responsável por regular uma protease lisossômica (catepsina L) em condições de jejum ou caquexia, enquanto no sistema UPS é necessário para a transcrição dos atrogenes *MAFBx* e *Murf1* (STITT et al., 2004; SANDRI et

al., 2004; KAMEI et al., 2004; MAMMUCARI et al., 2007; YAMAZAKI et al., 2010; RAJA et al., 2016). Sandri et al., (2004), observaram que miotubos tratados com *IGF-1* diminuíam a expressão de *Foxo1* e *MAFBx*, e quando a atividade da via *IGF-1/PI3K/AKT* era inibida ocorria o aumento dos níveis de transcrição do *Foxo1* e consequente indução do *MAFBx*. Pela análise do dados do transcriptoma podemos inferir que a expressão diminuída do fator de transcrição *Foxo1* no músculo SOL dos animais senis do grupo restrito esteja relacionado ao aumento dos níveis de *IGF-1*, o que acarretou na manutenção da expressão gênica dos atrogenes *Murf1* e *MAFBx*; isso é indicativo que outras vias podem estar envolvidas com o controle do catabolismo muscular observado na análise morfológica do músculo SOL nos animais restritos e senis.

Compondo a homeostase síntese/degradação proteica, as vias de anabolismo e crescimento celular influenciam no metabolismo muscular através do tamanho e número das fibras musculares (PARAKATI; DIMARIO, 2013; SCHIAFFINO et al., 2013). Os processos de proliferação e diferenciação são extremamente essenciais nos estágios iniciais de desenvolvimento, bem como em resposta a injúrias (SABOURIN; RUDNICKI, 2000; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; SCHIAFFINO et al., 2013). Os dados obtidos pelas análises do transcriptoma nos animais restritos e senis, demonstraram que estas vias também sofreram alterações durante o envelhecimento resultantes da restrição proteica perinatal, no qual três genes relacionados à biogênese (*Noct*, *Myc* e *Klf10*) se encontraram *down-regulados* nos músculos SOL e EDL.

A Nocturnina (*Noct*), também conhecida como *Ccrn4l*, é uma deadenilase circadiana que está envolvida com a embriogênese e com o metabolismo energético em adultos (BAGGS; GREEN, 2003; GARBARINO-PICO et al., 2007; NISHIKAWA et al., 2013). Nishikawa et al., (2013), observou que o nocaute da *Noct* em camundongos gerou um atraso no desenvolvimento embrionário inicial (fase que antecede o blastocito), enquanto os embriões que apresentavam o aumento na expressão deste gene foram severamente prejudicados em seu desenvolvimento; os autores sugerem que a *Noct* é essencial para o pré-implante normal e o desenvolvimento de embriões. O pro-oncogene *Myc*, também envolvido com a embriogênese, é um fator de transcrição que controla a proliferação e a diferenciação celular, além de controlar a atividade de miRNAs relacionados à diferenciação muscular (DAVIS et al., 1993; LIN et al., 2009; LUO et al., 2018). Davis et al., (1993), demonstrou que a mutação homozigota deste gene além de letal para os embriões de camundongos com 9,5 dias de gestação, resulta em um retardo no desenvolvimento, promove anormalidades no coração e no tubo neural. O Fator tipo *Krüppel 10* (*Klf10*), também relacionado com a biogênese, pertence a uma família de fatores transcricionais que através da ligação a elementos cis ricos em

nucleotídeos GC em regiões de regulação transcricional, podem agir como ativadores ou repressores transcricionais, estando envolvido com a proliferação e o suporte da MEC (DIMARIO, 2018). Parakati e DiMario, (2013), utilizando cultura celular de *Drosophila*, observaram que a superexpressão do *Klf10* reduzia a proliferação de mioblastos, através da inibição do receptor do fator de crescimento *FGF1*.

Visto que a expressão exata destes genes envolvidos com a embriogênese são essenciais para o desenvolvimento adequado do embrião, a desregulação em suas expressões não foram observadas nos estágios iniciais de desenvolvimento analisados neste trabalho (21 dias), porém as alterações nestas vias, derivadas da restrição proteica perinatal observadas na senilidade podem ser reflexo do atraso do crescimento muscular, apontadas pelos dados de hipotrofia muscular aos 21 dias, possivelmente envolvendo outras vias relacionadas com a biogênese.

O músculo esquelético é um importante reservatório energético, contendo inúmeras proteínas cuja principal função é transformar energia química em energia mecânica para a geração de força e movimentos (RAMÍREZ-OSGUERA et al., 2013; VECETTI-JUNIOR et al., 2016). O transcriptoma mostrou o gene relacionado ao metabolismo energético muscular *Aqp7*, *down-regulado* em ambos os músculos (SOL e EDL).

A aquaporina7 (*Aqp7*), também conhecida como aquagliceroporina, é uma proteína transmembrana responsável por formar canais permeáveis à glicerol, uma molécula importante para a formação de triglicerídeos, componente importante para o metabolismo muscular (BABA; ZHANG; WOLFE, 1995; AGRE, 2006; WAKAYAMA et al., 2014). Wakayama et al., (2014), observaram um aumento na expressão gênica da *Aqp7*, juntamente com o aumento de gotículas lipídicas no músculo quadríceps de camundongos obesos jovens (3 meses) provenientes do nocaute do gene *ob*. Lebeck; Søndergaard; Nielsen, (2018), também observaram um aumento na expressão gênica da *Aqp7* no músculo esquelético de pacientes obesos e diabéticos (DT2). Segundo os autores, a alteração na expressão da *Aqp7* altera o padrão metabólico muscular, gerando acúmulo de gordura intramuscular, embora o tecido utilize essa fonte de energia para sua manutenção. Nesta mesma linha de raciocínio, Green et al., (2007), demonstraram que, além de estar envolvida com os processos embrionários, a perda da *Noct* em camundongos também está associada com a dificuldade do ganho de peso e gordura corporal. Os autores sugerem que a *Noct* controla vias circadianas específicas relacionadas à captação e/ou utilização de lipídios, pois os animais nocautes para este gene demonstraram ser resistentes à obesidade induzida por dieta.

No nosso estudo, embora a gordura corporal total dos animais senis não tenha apresentado alterações, e testes relacionados a concentração de gordura intramuscular não

tenham sido realizados, o baixo peso dos animais senis submetidos a restrição proteica perinatal, juntamente com a regulação negativa do gene relacionado ao metabolismo lipídico (*Aqp7*) e *Noct*, em ambos os músculos estudados, sugere uma proteção dos músculos das alterações resultantes da restrição proteica perinatal, como diabetes tipo 2, resistência a insulina e obesidade (PAINTER; ROSEBOOM; BLEKER, 2005; VAAG et al., 2012; ELLIS et al., 2014; LOPEZ-LOPEZ et al., 2015; BEAUCHAMP; HARPER, 2016).

Aos 21 dias, a *Aqp7* encontrava-se superexpressa em ambos os músculos analisados. Uma das vias de regulação dessa aquagliceroporina no tecido muscular, ocorre através da leptina, hormônio produzido por adipócitos, que auxilia no metabolismo da glicose e ácidos graxos no tecido muscular (CEDDIA et al., 2011; WAKAYAMA et al., 2014). Jousse et al. (2011), analisando os efeitos da desnutrição materna perinatal, em camundongos aos 28 dias, observaram que embora houvesse maior consumo alimentar, a prole proveniente de genitoras apresentavam menor peso corporal e adiposidade. Os autores associaram esse desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético ao baixo nível de leptina (mRNA e proteína), devido à remoção da metilação no promotor do gene da leptina na prole restrita. Possivelmente, os altos níveis gênicos da *Aqp7* nos animais jovens restritos estejam envolvidos com regulação da leptina, na tentativa de manter o fluxo de glicerol às necessidades metabólicas do tecido muscular.

Outro fator importante para a manutenção da integridade e função muscular é a inervação que ocorre pela junção neuromuscular (JNM) (LEGAY; MEI, 2017). A proteína associada do receptor da sinapse (*Rapsn*), está localizada na membrana pós-sináptica da JNM ligando-se aos receptores de acetilcolina (*AchR*), sendo essencial para a sua formação (WU; XIONG; MEI, 2010; LEGAY; MEI, 2017). Alguns autores relacionam a *Rapsn* como uma proteína de ligação ao citoesqueleto muscular, auxiliando na agregação de *AchR* (ANTOLIK et al., 2007; DOBBINS et al., 2008). Antolik et al., (2007), demonstraram a interação da *Rapsn* com uma proteína do citoesqueleto (ACF7), que apresenta ligação com a actina e sugerem que os *AChRs* são imobilizados na membrana pós-sináptica mediados por esses componentes. Mitsui et al., (2000), observaram várias proteínas associadas com os *AChRs*, incluindo a *Rapsn* e proteínas sarcoméricas como actina, miosina, troponina e tropomiosina. Desta forma, a superexpressão da *Rapsn* encontrada no transcriptoma no músculo SOL dos animais restritos e senis, é um indicativo do seu papel na manutenção da organização da região pós-sináptica (ancoragem e estabilização dos *AChRs*, e ligação às proteínas sarcoméricas), mantendo assim a transmissão sináptica e auxiliando uma atividade muscular eficiente no músculo SOL, ainda que a força muscular possa estar comprometida, tendo em vista a diminuição da AST observada na morfologia.

Outro componente do tecido muscular é a matriz extracelular (MEC) muscular, composta por colágeno I, II, III e IV, proteoglicanos e glicoproteínas como laminina e fibronectina, importante para a manutenção da integridade estrutural, nutricional e mecanotransdução muscular (VOYTIK et al., 1993; VELLEMAN, 1999). As análises do transcriptoma revelaram a superexpressão dos genes envolvidos com a manutenção da MEC (*Fmod* e *Chad*) nos músculos SOL e EDL dos animais restritos e senis.

A Fibromodulina (*Fmod*) pertence a uma família de glicoproteínas/proteoglicanos da MEC envolvida na organização estrutural das fibras de colágeno nos tecidos conjuntivos, bem como na regulação do crescimento muscular (HILDEBRAND et al., 1994; SVENSSON et al., 1999; ÖNNERFJÖRD; HEATHFIELD; HEINEGÅRD, 2004; LEE et al., 2016). Svensson et al., (1999), demonstrou que na ausência do gene funcional *Fmod*, camundongos apresentavam fibras de colágeno mais finas e anormais no tendão, sugerindo um menor suporte mecânico para este tecido. Lee et al., (2016), observaram que células C2C12 superexpressavam a Miostatina na ausência de *Fmod*, e quando presente, a *Fmod* inibia a Miostatina favorecendo o crescimento muscular. A Condroadherina (*Chad*), embora pouco descrita no músculo esquelético, a sua função e localização na cartilagem é bem definida, sendo encontrada nas regiões de crescimento, como nas zonas de proliferação e hipertrófica, onde interage com o colágeno e a integrina (proteína de membrana celular) mediando a adesão dos condrócitos (SHEN et al., 1998; HAGLUND et al., 2011). Hessle et al., 2013, observaram que camundongos nocautes para *Chad* embora não demonstrassem alterações anatômicas, problemas de fertilidade ou de crescimento, apresentavam um fenótipo distinto, como o alargamento da placa de crescimento epifisário e alterações estruturais e funcionais no tecido ósseo. Deng et al., (2017), utilizando banco de dados, verificaram que a expressão da *Chad* estava diminuída em tecidos cancerosos (carcinoma hepatocelular) juntamente com a alteração de genes envolvidos com a adesão focal celular, no qual pacientes com maiores níveis de expressão deste gene apresentavam uma maior sobrevivência, e que, o nocaute da *Chad in vitro* aumenta a atividade proliferativa e de migração das células cancerosas.

No nosso estudo, a superexpressão dos genes *Fmod* e *Chad* no grupo restrito e senil pode indicar uma possível reorganização dos componentes da MEC muscular em decorrência da redução da AST. A redução da AST das fibras musculares (atrofia) pode estar associada com o aumento dos componentes da MEC, principalmente o colágeno I e III, processo denominado fibrose (GILLIES; LIEBER, 2011; DIMARIO, 2018). Embora os músculos SOL e EDL tenham apresentado uma diminuição na AST aos 21 dias e o SOL na senilidade, a expressão gênica do colágeno IaI e III não demonstraram alterações em ambos os músculos estudados (SOL e EDL)

nos animais restritos e senis (540 dias), bem como a análise morfológica do Picrossírios (dados não mostrados). Além de estar relacionado com a proliferação celular. DiMario, (2018), observou que camundongos normais e *mdx* nocautes para *Klf10*, apresentavam aumento nos níveis de expressão de *MMP2*, proteinases responsáveis pela degradação do colágeno, sugerindo que *Klf10* também tenha participação na manutenção da MEC.

Ainda relacionado com o suporte estrutural do músculo esquelético, o membro da família de proteínas de choque térmico B7 (*Hspb7*), chaperona músculo estriado, auxilia na estabilização do citoesqueleto, mostrou-se *down*-regulado nas análises do transcriptoma, nos músculos SOL e EDL (VOS; KANON; KAMPINGA, 2009; JUO et al., 2016). Wu et al., (2017), demonstraram que embriões de camundongos nocautes para *Hspb7* apresentavam uma diminuição no tamanho total do coração, alterações morfológicas nos cardiomiócitos e desorganização nos sarcômeros, prejudicando sua função contrátil. Também utilizando camundongos nocautes, Juo et al., (2016), observaram que adultos (12 e 24 semanas) apresentavam interrupções sarcoméricas, além de desorganização miofibrilar no músculo diafragma, demonstrando que a deficiência deste gene está associada com alterações na integridade do sarcômero, acarretando a diminuição da capacidade respiratória destes animais.

No nosso estudo, a superexpressão dos genes *Fmod* e *Chad* juntamente com a baixa expressão do *KLF10* observada pelas análises do transcriptoma no grupo restrito e senil, nos músculos SOL e EDL, é um indicativo que possivelmente um dos mecanismos utilizados para a manutenção do fenótipo muscular nesta condição, ocorra através da manutenção da integridade dos componentes da MEC. É possível que a diminuição da expressão do *Hspb7*, esteja envolvida com as alterações do citoesqueleto da fibra muscular, que poderia comprometer a função muscular.

As análises morfológicas demonstraram que o músculo EDL foi menos acometido pelos estímulos submetidos neste estudo, e embora alguns genes apresentam o mesmo comportamento nos diferentes tipos musculares, o gene estrutural *Tbhs7* apresentou superexpressão apenas neste músculo. A Trombospondina 4 (*Thbs4*), pertencente a uma família de genes que codificam proteínas da MEC secretadas, é responsáveis por interagir com a fibronectina, colágeno e proteoglicanos (HAUSER et al., 1995; SCHELLINGS et al., 2009; ADAMS; LAWLER, 2011; LYNCH et al., 2013). Estando envolvido com o reparo muscular após lesão, crescimento e remodelação, sendo diretamente relacionado com a estabilidade do sarcolema através da interação com a proteína de membrana integrina (ADAMS; LAWLER, 2011; VANHOUTTE et al., 2016). Vanhoutte et al., (2016), observaram que a *Thbs4* aumenta o fluxo de chaperonas do complexo de distrofina- glicoproteína (CDG) e de ligação à integrina,

possibilitando uma maior integridade da miofibrila, e que o nocaute para esse gene leva a alterações distróficas espontâneas com o envelhecimento. No músculo EDL dos animais do grupo restrito e senis, além da integridade da MEC, é possível que haja uma maior estabilidade do sarcolema, auxiliando na manutenção do fenótipo muscular.

7. CONCLUSÕES

A restrição proteica durante a gestação e lactação interferiu na manutenção do peso corporal durante a fase juvenil e na senilidade e promoveu atraso no desenvolvimento muscular nos animais aos 21 dias.

Os dados moleculares sugerem uma adaptação dos músculos SOL e EDL à condição de restrição proteica perinatal durante a senilidade, envolvendo componentes relacionados com a integridade da MEC, favorecendo a manutenção do fenótipo no músculo EDL e atenuando a redução da AST no músculo SOL.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. C.; LAWLER, J. The Thrombospondins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 10, p. 1-29, 2011.
- AGRE, P. Aquaporin Water Channels. **PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 2006.
- ALLEN, D. L.; UNTERMAN, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. **American Journal of Cell Physiol**, v. 292, n. 1, p. C188-C199, 2007.
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential Expression analysis for sequence count data. **Nature Preceedings**, v. 11, n. 10, p. 1-12, 2010.
- ANTOLIK, C. et al. The actin binding domain of ACF7 binds directly to the tetratricopeptide repeat domains of rapsyn. **Neuroscience**, v. 145, n. 1, p. 56-65, 2007.
- BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 4, p. 477-487, 2010.
- BABA, H.; ZHANG, X. J.; WOLFE, R. R. Glycerol gluconeogenesis in fasting humans. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 11, n. 2, p. 149-153, 1995.
- BAGGS, J. E.; GREEN, C. B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: A mechanism for postranscriptional control of circadian-related mRNA. **Current Biology**, v. 13, n. 3, p. 189-198, 2003.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 43, n. 3, p. 237-240, 1989.
- BATTISTA, M.-C. et al. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 1, p. E124-E131, 2002.
- BAYOL, S. et al. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n.3, p. 331-339, 2004.
- BEAUCHAMP, B.; HARPER, M. E. In utero undernutrition programs skeletal and cardiac muscle metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 401, p. 1-7, 2016.
- BINNECK, E. As ômicas: Integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 28-37, 2004.
- BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina

sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.

BROOKS, S. V; FAULKNER, J. A. Skeletal Muscle Weakness in Old Age: Underlying Mechanisms. **Medicine & Science in Sport & Exercise**, v. 26, n. 4, p. 32–439, 1994.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CABEÇO, L. C. et al. Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and myogenin expression in offspring. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, n.5, p. 461–471, 2012.

CACCIA, M. R.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents. **Muscle & Nerve**, v. 2, n. 3, p. 202–212, 1979.

CARLSON, M. E. et al. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. **EMBO Molecular Medicine**, v. 1, n. 8–9, p. 381–391, 2009.

CASTRO, P. A. T. et al. Neuromuscular junctions (NMJs): ultrastructural analysis and nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit mRNA expression in offspring subjected to protein restriction throughout pregnancy. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n.2, p. 109–116, 2017.

CEDDIA, R. B.; WILLIAM, W. N.; CURI, R. The response of skeletal muscle to leptin. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, n. 12, p. 90–97, 2001.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 209–238, 2004.

CHEEMA, K. K. et al. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 471–477, 2005.

COHEN, S.; NATHAN, J. A.; GOLDBERG, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 58–74, 2015.

CONFORTIM, H. D. et al. Effects of aging and maternal protein restriction on the muscle fibers morphology and neuromuscular junctions of rats after nutritional recovery. **Micron**, v. 71, p. 7–13, 2015.

CONFORTIM, H. D. et al. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation affects the development of muscle fibers and neuromuscular junctions in rats. **Muscle & Nerve**, v. 55, n. 1, p. 109–115. 2017.

D'ANTONA, G. et al. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibers in male body builders. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 3, p. 611–627, 2006.

DAVIS, A. C. et al. A null c - m y c mutation causes lethality before 10 . 5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. **Genes &Development**, v. 7, n. 4, p. 671–682, 1993.

DE BRITO ALVEZ, J. L. et al. Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 41, p. 117-123, 2017.

DE PAULA, T. G. et al. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 1–20, 2017.

DENG, X. et al. Tumor repressor gene chondroadherin oppose migration and proliferation in hepatocellular carcinoma and predicts a good survival. **Oncotarget**, v. 8, n. 36, p. 60270–60279, 2017.

DIMARIO, J. X. KLF10 Gene Expression Modulates Fibrosis in Dystrophic Skeletal Muscle. **American Journal of Pathology**, v. 188, n. 5, p. 1263–1275, 2018.

DOBBINS, G. C. et al. alpha-Actinin interacts with rapsyn in agrin-stimulated AChR clustering. **Molecular Brain**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2008.

DOMINGUES-FARIA, C. et al. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 22–36, 2016.

DUMONT, N. A. et al. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 6, p. 1027–1059, 2015.

DOW, D. E. et al. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle and Nerve**, v. 30, n. 1, p. 77–86, 2004.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochemie**, v. 2, n. 2, p. 105–17, 1960.

ELLIOTT, A.; OFFER, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. **Journal of Molecular Biology**, v. 123, n. 4, p. 505–519, 1978.

ELLIS, P. J. I. et al. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming. **BMC genomics**, v. 15, n. 49, p. 1-18, 2014.

EVERAERT, C. et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole transcriptome RT-qPCR expression data. **Scientific Report**, v. 8, n. 7, 2017.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSINET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 456, n. 3, p. 587–600, 2008.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **THE**

STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD. p. 1-189, 2017[s.l: s.n.].

FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, A. D.; FORHEAD, A. J. Intrauterine Programming of Physiological Systems : Causes and Consequences. **Physiology**, v. 21, n.1, p. 29–37, 2006.

GARBARINO-PICO, E. et al. Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli. **Rna**, v. 13, n. 5, p. 745–755, 2007.

GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; LE BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2008.

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

GLASS, D. J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 87–90, 2003.

GOULDING, M.; LUMSDEN, A.; PAQUETTE, A J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n. 4, p. 957–971, 1994.

GREEN, C. B. et al. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p. 9888–9893, 2007.

HAGLUND, L. et al. Identification and characterization of the integrin $\alpha 2\beta 1$ binding motif in chondroadherin mediating cell attachment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3925–3934, 2011.

HAUSER, N. et al. Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). **FEBS Letters**, v. 368, n. 2, p. 307–310, 1995.

HESSLE, L. et al. The Skeletal Phenotype of Chondroadherin Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

HILDEBRAND, A. et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. **The Biochemical Journal**, v. 302, n. 2, p. 527–34, 1994.

HOPPELER, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. **International Journal of Sport Medicine**, v. 7, n. 4, p. 187–204, 1986.

HUGHES, S. M. et al. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. **Development (Cambridge, England)**, v. 118, n. 4, p. 1137–1147, 1993.

HUGHES, S. M. et al. Myogenin Induces a Shift of Enzyme Activity from Glycolytic to Oxidative Metabolism in Muscles of Transgenic Mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 3, p. 663–642, 1999.

HUXLEY, H. E. The Mechanism of Muscular Contraction. **Science**, v. 164, n. 3886, p. 1356-1365, 1969.

IBGE. PNAD 2016: população idosa cresce 16,0% frente a 2012 e chega a 29,6 milhões. <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/18263-pnad-2016-populacao-idosa-cresce-16-0-frente-a-2012-e-chega-a-29-6-milhoes>> visualizado em 24/07/2018 - 13:52

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. C834-843, 2004.

JANSSEN, I. Influence of sarcopenia on the development of physical disability: The cardiovascular health study. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 54, n. 1, p. 56–62, 2006.

JANSSEN, I.; HEYMSFIELD, S. B.; ROSS, R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, n. 5, p. 889–896, 2002.

JOHANNSEN, D. L. et al. Ectopic lipid accumulation and reduced glucose tolerance in elderly adults are accompanied by altered skeletal muscle mitochondrial activity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 1, p. 242–250, 2012.

JOHNSTON, I. A.. Sustained Force Development: Specializations and Variation Among the Vertebrates. **Journal of Experiment Biomol**, v. 115, p. 239–251, 1985.

JOUSSE, C., L. et al. Perinatal Undernutrition Affects the Methylation and Expression of the Leptin Gene in Adults: Implication for the Understanding of Metabolic Syndrome. **The FASEB Journal**, v. 25, n.9, p. 3271–78, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**.In: Tecido Muscular. p. 182–203, 2008.

JUO, L.-Y. et al. HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 8, p. 1661–1670, 2016.

KAMEI, Y. et al. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 41114–41123, 2004.

KILKENNY, C. et al. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines checklist. **British Journal of Pharmacology**, p.1577-1579, 2010.

KIM J. et al. Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. **J. Appl. Physiol.** **2005;99:2149–58.**

KITAMURA, T. et al. A Foxo / Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2477–2485, 2007.

KOPS, G. J. P. L. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature**, v. 419, n. 6904, p. 316–321, 2002.

LARSSON, L.; ANSVED, T. Effects of Ageing on the Motor Unit. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 5, p. 397–458, 1995.

LAYEC, G.; HASELER, L. J.; RICHARDSON, R. S. Reduced muscle oxidative capacity is independent of O₂ availability in elderly people. **Age**, v. 35, n. 4, p. 1183–1192, 2013.

LEANDRO, C. G. et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **European Journal of Nutrition**, p. 807-8015, 2011.

LEBECK, J.; SØNDERGAARD, E.; NIELSEN, S. Increased AQP7 abundance in skeletal muscle from obese men with type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 3, p. E367–E373, 2018.

LEE, E. J. et al. Fibromodulin: A master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program. **FASEB Journal**, v. 30, n. 8, p. 2708–2719, 2016.

LEGAY, C.; MEI, L. Moving forward with the neuromuscular junction. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. Suppl 2, p.59–63, 2017.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2011.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 923–930, 2014.

LIN, C. et al. Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 20, p. 3157–3170, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LIU, Y.; ZHOU, J.; WHITE, P. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?. **Bioinformatics**, v. 30, n. 3, p. 301-304, 2014

LOPEZ-LOPEZ, J. et al. The Link between Fetal Programming, Inflammation, Muscular Strength, and Blood Pressure. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

LOWEY, S. et al. Substructure of the myosin molecule: I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **Journal of Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 1–29, 1969.

LUO, W. et al. c-Myc inhibits myoblast differentiation and promotes myoblast proliferation and muscle fiber hypertrophy by regulating the expression of its target genes , miRNAs and lincRNAs. **Cell Death & Differentiation**, p. 1–17, 2018.

LYNCH, J. M. et al. A Thrombospondin-Dependent Pathway for a Protective ER Stress Response. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1257–1268, 2013.

MAGAUDDA, L. et al. Effects of Physical Exercise on Skeletal Muscle Fiber: Ultrastructural and Molecular Aspects. **Journal of Basic Appl Myol**, v. 14, n. 1, p. 17–21, 2004.

MALLINSON, J. E. 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. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 292–9, 2007.

MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 458–471, 2007.

MCKINNELL, I. W.; RUDNICKI, M. A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. **Cell**, v. 119, n.7, p. P907–910, 2004.

MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, n. 9-10, p. 723–732, 1995.

MERCKEN, E. M. et al. Conserved and species-specific molecular denominators in mammalian skeletal muscle aging. **npj Aging and Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 1– 21, 2017.

MITSUI, T. et al. Functional Association Between Nicotinic Acetylcholine Receptor and Sarcomeric Proteins Via Actin and Desmin Filaments. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.77, n.4, p. 584- 595, 2000.

MOLKENTIN, J. D. et al. Defining the regulatory networks for muscle development Jeffery D Molkentin and Eric N Olson. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 6, n. 4, p. 445–453, 1996.

MURGIA, M. et al. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 142–147, 2000.

NISHIKAWA, S. et al. Functional Analysis of Nocturnin, a Circadian Deadenylase, at Maternal-to-zygotic Transition in Mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 3, p. 258–265, 2013.

OLGUIN, H. et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. **The Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 5, p. 769-779, 2007.

OGG, S. et al. The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 994–999, 1997.

ÖNNERFJORD, P.; HEATHFIELD, T. F.; HEINEGÅRD, D. Identification of Tyrosine Sulfation in Extracellular Leucine-rich Repeat Proteins Using Mass Spectrometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 26–33, 2004.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, n. 12, p. 1–10, 2010.

OZANNE, S. E.; HALES, C. N. The long-term consequences of intra-uterine protein

malnutrition for glucose metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 3, p. 615–619, 1999.

PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J.; BLEKER, O. P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. **Reproductive Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 345–352, 2005.

PARAKATI, R.; DIMARIO, J. X. Repression of myoblast proliferation and fibroblast growth factor receptor 1 promoter activity by KLF10 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13876–13884, 2013.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v.77, n.1. ahead, p. 83-91, 2016.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions1. **Microsc.Res.Tech.**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 2000.

PILEGGI, C. A. et al. maternal high fat diet alters skeletal muscle mitochondrial catalytic activity in adult male rat offspring. **Frontiers in Physiology**, v.7, p. 1-11, 2016

PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 3, p. 1038–1044, 2003.

RAJA, J. S. et al. Short CommRestricted maternal nutrition alters myogenic regulatory factor expression in satellite cells of ovine offspring. **Animal**, v. 10, n. 7, p. 1200–1203, 2016.

RAMÍREZ-OSEGUERA, R. T. et al. Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1024–1039, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763-774, 2013.

RINALDI, J. C. et al. Maternal protein malnutrition: effects on prostate development and adult disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 4, p. 361- 372, 2018.

RUIZ-ROSADO, A. et al. Histo enzymatic and morphometric analysis of muscle fiber type transformation during the postnatal development of the chronically food-deprived rat. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 372–381, 2013.

SABOURIN, L. A.; RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v. 57, n. 1, p. 16–25, 2000.

SACHECK, J. M. et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes

similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 140–155, 2007.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. Sarcopenia and cachexia: The adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 2, p. 77–94, 2012.

SANCHEZ, A. M. J.; CANDAU, R. B.; BERNARDI, H. FoxO transcription factors: Their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 9, p. 1657–1671, 2014.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004.

SANDRI, M. Autophagy in skeletal muscle. **FEBS Letters**, v. 584, n. 7, p. 1411–1416, 2010.

SÄNGER, A.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. **Fish physiology**, v. 18, p. 187–250, 2001.

SANTOS, S. A. A. et al. Maternal low protein diet impairs prostate growth in young rat offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **The Journals of Gerontology**, 2018.

SARTORELLI, V.; FULCO, M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. **Science Signaling**, v. 2004, n. 244, p. 1–10, 2004.

SCHELLINGS, M. W. M. et al. Thrombospondins in the heart: Potential functions in cardiac remodeling. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 3, n. 3–4, p. 201–213, 2009.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 17, p. 4294–4314, 2013.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 2, p. 493–501, 1994.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–531, 2011.

SEWARD, D. J. et al. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. **American Journal of Physiol Cell**, v. 280, n. 2, p. C408–C413, 2001.

SHARPLES, A. P. et al. Longevity and skeletal muscle mass: The role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. **Aging Cell**, v. 14, n. 4, p. 511–523, 2015.

SHARPLES, A. P.; STEWART, C. E.; SEABORNE, R. A. Does skeletal muscle have an “epi”-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. **Aging Cell**, v. 15, n. 4, p. 603–616, 2016.

SHEN, Z. et al. Chondroadherin expression changes in skeletal development. **The Biochemical journal**, v. 330, n. 1, p. 549–557, 1998.

SHORT, K. R. et al. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 1, p. E92-101, 2004.

SILLAU, A. H.; BANCHERO, N. Skeletal Muscle Fiber Size and Capillarity. **Proc Soc Exp Bio Med**, v. 158, n. 2, p. 288–291, 1978.

SINGH, K.; DILWORTH, F. J. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. **FEBS Journal**, v. 280, n. 17, p. 3991–4003, 2013.

STARON, R. S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, n. 2, p. 117–123, 1999.

STITT, T. N. et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 395–403, 2004.

SVENSSON, L. et al. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9636–9647, 1999.

SYMEON, G. K. et al. Effects of gestational maternal undernutrition on growth, carcass composition and meat quality of rabbit offspring. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2015.

TARRY-ADKINS, J. L. et al. Poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth induces an accelerated aging phenotype and oxidative stress in skeletal muscle of male rats. **The Company of Biologists**, v.9, n. 10, p. 1221-1229, 2016.

TENG, M. et al. Erratum to: A benchmark for RNA-seq quantification pipelines. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 2016.

TOSCANO, A. E; MANHÃES-DE-CASTRO, R; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270–278, 2008.

VAAG, A. A. et al. The thrifty phenotype hypothesis revisited. **Diabetologia**, v. 55, n. 8, p. 2085–2088, 2012.

VAISERMAN A. Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? **Clin Epigenetics**, v. 7, n. 96, 2015

VANHOUTTE, D. et al. Thrombospondin expression in myofibers stabilizes muscle membranes. **eLife**, v. 5,p. 1–33, 2016.

VECHETTI, I. J. et al. Aerobic Exercise Recovers Disuse-induced Atrophy Through the Stimulus of the LRP130/PGC-1 α Complex in Aged Rats. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 601–609, 2016.

- VELLEMAN, S. G. The Role of the Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development 1. **Poultry Science**, v. 78, n. 5, p. 778–784, 1999.
- VOS, M. J.; KANON, B.; KAMPINGA, H. H. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 8, p. 1343–1353, 2009.
- VOYTIK, S. L. et al. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. **Developmental Dynamics**, v. 198, n. 3, p. 214–224, 1993.
- WAKAYAMA, Y. et al. Upregulated Expression of AQP 7 in the Skeletal Muscles of Obese ob/ob Mice. **Acta Histochemica Et Cytochemica**, v. 47, n. 1, p. 27–33, 2014.
- 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.
- WOLFON, L. et al. Strength is a major factor in balance, gait, and the occurrence of falls.. v. 50A, p. 64–67, 1995.
- WOLFE, R. R. Branched-Chain Amino Acids in Exercise Skeletal Muscle Protein Metabolism and Resistance Exercise. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 2, p. 525S–528S, 2006.
- WU, C.-L.; SATOMI, Y.; WALSH, K. RNA-seq and metabolomic analyses of Akt1- mediated muscle growth reveals regulation of regenerative pathways and changes in the muscle secretome. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2017.
- WU, H.; XIONG, W. C.; MEI, L. To build a synapse : signaling pathways in neuromuscular junction assembly. **Development**, v. 137, n. 7, p. 1017–1033, 2010.
- WU, T. et al. HSPB7 is indispensable for heart development by modulating actin filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 45, p. 201713763, 2017.
- YAMAZAKI, Y. et al. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. **Biochemical Journal**, v. 427, n. 1, p. 171–178, 2010.
- YANG, I. S.; KIM, S. Analysis of Whole Transcriptome Sequencing Data: Workflow and Software. **Genomics & informatics**, v. 13, n. 4, p. 119–25, 2015.
- ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 11, p. 1177–1191, 2006.
- ZHU, M.-J. et al. Effect of Maternal Nutrient Restriction in Sheep on the Development of Fetal Skeletal Muscle1. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1968–1973, 2004.
- ZHU, M. J. et al. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **Journal of Physiology**, v. 575, n.1, p. 241–250, 2006.

ZOHDI, V. et al. Evidence of altered biochemical composition in the hearts of adult intrauterine growth-restricted rats. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n.2, p. 749–758, 2013.

ZOU, T. et al. Moderate Maternal Energy Restriction during Gestation in Pigs Attenuates Fetal Skeletal Muscle Development Through Changing Myogenic Gene Expression and Myofiber Characteristics. **Reproductive Sciences**, v. 24, n. 1, p. 156–167, 2017.

9. APÊNDICES

9.1. Lista de genes *up-regulados* no músculo Sóleo

Aaed1 - *AhpC/TSA Antioxidant Enzyme Domain Containing 1*

Adig-*Adipogenin*

Afap111 -*Actin Filament Associated Protein 1 Like 1*

Ccdc28b - *Coiled-Coil Domain Containing 28B*

Ccdc92 - *Coiled-Coil Domain Containing 92*

Chad – *Chondro adherin* **Clu** -*Clusterin*

Cnp -*2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase*

Cntn2-*Contactin 2*

Crhr2-*Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2*

Cyp4f6-*CytochromeP450 Family 4 Subfamily F Member 3*

Dnaaf2-*Dynein Axonemal Assembly Factor 2*

Ephx1- *Epoxide Hydrolase 1*

Fam213b-*Family With Sequence Similarity 213 Member B*

Fmod-*Fibromodulin*

Gstm7-*Glutathione S-Transferase Mu*

Hlf -*HLF, PAR BZIP Transcription Factor*

Ier3-*Immediate Early Response 3*

Kcnc4-*Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily C Member 4*

Klhl33-*Kelch Like Family Member 33*

Lsm10-*LSM10, U7 Small Nuclear RNA Associated*

Lsmem1-*Leucine Rich Single-Pass Membrane Protein 1*

Mcm4-*Minichromosome Maintenance Complex Component 4*

Mettl7a-*Methyltransferase Like 7A*

Mfap4-*Microfibril Associated Protein 4*

Mlf1-*Myeloid Leukemia Factor 1*

Mmgt2-*Membrane Magnesium Transporter2*

Mpz -*Myelin Protein Zero*

Mypop-*Myb Related Transcription Factor, Partner Of Profilin*

Naglt1 -*Major Facilitator Superfamily Domain Containing 4B*

Neu3-*Neuraminidase 3*

Nrep-Neuronal Regeneration Related Protein
Pacrg-Parkin Coregulated
Phyhd1 - Phytanoyl-CoA Dioxygenase Domain Containin 1
Pogk -Pogo Transposable Element Derived With KRAB Domain
Rapsn-Receptor Associated Protein Of The Synapse
Rnf225 -Ring Finger Protein 225
Sh3rf2-SH3 Domain Containing Ring Finger 2
Slc47a1-Solute Carrier Family 47 Member 1
Tnnt3 -Troponin T3
Tpd52-Tumor Protein D52
Tpm1-Tropomyosin 1
Trim 31 - Tripartite Motif Containing 31
Uckl1-Uridine-Cytidine Kinase 1 Like 1
Xpnpep3-X-Prolyl Aminopeptidase 3
YbeY-YbeY Metalloendoribonuclease

9.2. Lista de genes *down-regulados* no músculo Sóleo

Abcb9 - ATP Binding Cassette Subfamily B Member 9
Adam1a - ADAM Metallopeptidase Domain 1A
Ahnak2 - AHNAK Nucleoprotein 2
Akap1 - A-Kinase Anchoring Protein 1
Ankrd1 - Ankyrin Repeat Domain 1
Apold 1 - Apolipoprotein L Domain Containing 1
Aqp7 - Aquaporin 7
Arhgap24 - Rho GTPase Activating Protein 24
Arntl - Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like
Clcn3 - Chloride Voltage-Gated Channel 3
Clcnkb - Chloride Voltage-Gated Channel Kb
Cpd - Carboxypeptidase D
Dgat1 - Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
Dgke - Diacylglycerol Kinase Epsilon
Erp29 - Endoplasmic Reticulum Protein 29

Fbox40 - *F-Box Protein 40*
Fitm2 - *Fat Storage Inducing Transmembrane Protein 2*
Foxo1 - *Forkhead Box O1*
Hccs - *Holocytochrome C Synthase*
Hspa5 - *Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5*
Hspb7 - *Heat Shock Protein Family B (Small) Member 7*
Ids - *Iduronate 2-Sulfatase*
Ifrd1 - *Interferon Related Developmental Regulator 1*
Klf10 - *Kruppel Like Factor 10*
Lrrc30 - *Leucine Rich Repeat Containing 30*
Mtfp1 - *Mitochondrial Fission Process 1*
Myc - *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*
Noct - *Nocturnin*
Nuak1 - *NUAK Family Kinase 1*
Ocrl - *OCRL, Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase*
Odc1 - *Ornithine Decarboxylase 1*
Pank1 - *Pantothenate Kinase*
Pla1a - *Phospholipase A1 Member A*
Plin4 - *Perilipin 4*
Pmepa1 - *Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1*
Pstpip2 - *Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2*
Rhbdd1 - *Rhomboid Domain Containing 1*
Sik1 - *Salt Inducible Kinase 1*
Slc25a22 - *Solute Carrier Family 25 Member 22*
Slc41a3 - *Solute Carrier Family 41 Member 3*
Tbx15 - *T-Box 15*
Trafd1 - *TRAF-Type Zinc Finger Domain Containing 1*
Usp16 - *Ubiquitin Specific Peptidase 16*
Zfp770 - *Zinc Finger Protein 770*

9.3. Lista de genes *up-regulados* no músculo EDL

Acvr2b - *Activin A Receptor Type 2B*
Afp11l1 - *Actin Filament Associated Protein 1 Like 1*

Angptl2-Angiopoietin Like 2
Cc2d2a-Coiled-Coil And C2 Domain Containing 2A
Chad-Chondroadherin
Col24a1 -Collagen Type XXIV Alpha 1 Chain
Fam110d -Family With Sequence Similarity 110 Member D
Fam78a-Family With Sequence Similarity 78 Member A
Fmod-Fibromodulin
Rgs4-Regulator of G Protein Signaling 4
Mybl2-Myeloid Leukemia Factor 1
MLXIP-MLX Interacting Protein
PML - Promyelocytic Leukemia
RGD1307461-Similar to RIKEN cDNA 6430571L13; Similar to Proteína G20
SLC5A1-Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 5A1
TBC1D4-TBC1 Domain Family Member 4
TEAD1 - TEA Domain Transcription Factor 1
THBS4-Thrombospondin 4
TNIK-TRAF2 and NCK Interacting Kinase
WIP3-WAS/WASL Interacting Protein Family Member 3

9.4. Lista de genes down-regulados no músculo EDL

Acot2 - Acyl-CoA Thioesterase 2
Ankrd1 - Ankyrin Repeat Domain 1
Apold1 - Apolipoprotein L Domain Containing 1
AQP7 - Aquaporin 7
Arc - ActivityRegulated Cytoskeleton Associated Protein
Bcl6b - B Cell CLL/Lymphoma 6B
Btg2 - BTG Anti-Proliferation Factor 2
CLND5 - Claudin 5
FAM43A - Family With Sequence Similarity 43 Member A
Hes1 - Hes Family BHLH Transcription Factor 1
HSPB7 - HeatShock Protein Family B (Small) Member 7
ID1 - Inhibitor of DNA Binding 1, HLH Protein

Klf10 - *Kruppel Like Factor 10*

Lrrc30 - *Leucine Rich Repeat Containing 30*

Mybph - *Myosin Binding Protein H*

Myc - *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*