

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**REABILITAÇÃO**

**REBECCA SALOMÃO DE CARVALHO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Brasília,**  
**Junho de 2022**

**REBECCA SALOMÃO DE CARVALHO**

**TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO E AS ADAPTAÇÕES  
MOLECULARES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO NA PROLE  
SUBMETIDA À DIETA HIPERLIPÍDICA**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação (PPG-CR) da Universidade de Brasília, como pré-requisito para defesa de Mestrado.

Linha de pesquisa: Processos Biológicos Aplicados à Estrutura, Função e Reabilitação.

Tema: Plasticidade Musculoesquelética.

Orientador(a): Prof. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Marqueti Durigan

**Brasília,**

**Junho de 2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

St SALOMÃO DE CARVALHO, REBECCA  
TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO E AS ADAPTAÇÕES MOLECULARES  
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO NA PROLE SUBMETIDA À DIETA  
HIPERLIPÍDICA / REBECCA SALOMÃO DE CARVALHO; orientador  
RITA DE CÁSSIA MARQUETI DURIGAN. -- Brasília, 2022.  
157 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências da  
Reabilitação) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. matriz extracelular. 2. músculo esquelético. 3. dieta  
hiperlipídica. 4. efeitos intergeracionais. 5. treino de  
força. I. MARQUETI DURIGAN, RITA DE CÁSSIA, orient. II.  
Título.

**REBECCA SALOMÃO DE CARVALHO**

**TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO E AS ADAPTAÇÕES  
MOLECULARES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO NA PROLE  
SUBMETIDA À DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade de Brasília.

Aprovado em 07 / 06 / 2022

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Rita de Cassia Marqueti Durigan  
Universidade de Brasília  
Presidente

---

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira  
Universidade de Brasília  
Membro interno

---

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari  
Instituição: Universidade Nove de Julho  
Membro externo

---

Prof. Dr. Josevan Cerqueira Leal  
Universidade de Brasília  
Membro interno Suplente

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, por ser meu exemplo de força e coragem.

Aos meus entes queridos, os quais serei eternamente grata pelo cuidado, zelo, incentivo, apoio e orações.

## AGRADECIMENTOS:

À professora Rita de Cássia Marqueti Durigan, pela orientação inegavelmente segura e eficiente, além das valiosas sugestões e estímulos concedidos durante a minha trajetória acadêmica.

Aos professores da graduação em Fisioterapia das instituições pelas quais passei, especialização e do Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade de Brasília e colaboradores, pelo incentivo em prol da qualidade da pesquisa, além do crescimento acadêmico da instituição.

À Universidade de Brasília, pelas possibilidades concedidas.

Aos técnicos de Laboratório, por terem contribuído com os meus experimentos de Zimografia ao retirarem os meus géis da estufa quando eu não o podia fazer, além de toda a equipe imprescindível que proporcionou a estrutura para o desenvolvimento das minhas atividades durante esse período

Aos colegas e amigos de Mestrado, pela convivência e troca de experiências, das quais jamais esquecerei.

Ao grupo de pesquisa em Plasticidade Musculotendínea (GPlasT), por me ensinar – além de ciência e biologia molecular (*biomol*) – tanto sobre a importância da empatia e do trabalho em grupo, considerando as individualidades, graus diferentes de conhecimento sobre *biomol* e experiências de vida, que são mescladas e complementadas durante o desenvolvimento das atividades.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Às pessoas que passaram pelo meu caminho e que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dos meus trajetos pessoais e acadêmicos.

À minha mãe querida, com destaque, por ser pai, mãe e minha base.

Aos amigos e entes queridos pelo apoio, orações e motivações.

Sobretudo, a Deus, que utilizou as adversidades durante o Mestrado para me ensinar sobre Perseverança e Paciência, além de me fortalecer para que eu pudesse chegar até aqui. “*Sê forte e corajoso.*” *Josué 1:9.*

“Penso noventa e nove vezes e nada descobro; deixo de pensar,  
mergulho em profundo silêncio - e eis que a verdade se me revela.”

Albert Einstein

“Há em mim uma sede de infinito.”

Florbela Espanca

## RESUMO:

**Introdução:** Apesar de alguns estudos demonstrarem que a dieta hiperlipídica promove efeitos adversos no remodelamento da matriz extracelular (MEC) muscular, os mecanismos envolvidos no trofismo muscular, inflamação e adipogênese ainda permanecem sem investigação aprofundada. Assim, investigamos os efeitos de 8 semanas de treinamento de força (TF) paterno na expressão/atividade de genes e proteínas de fatores críticos envolvidos na inflamação muscular e remodelamento de pais e proles (proles submetidas a dieta controle ou hiperlipídica). **Objetivo:** Investigar os efeitos do treinamento de força paterno sobre as adaptações moleculares relacionadas ao remodelamento muscular esquelético nas proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica. **Metodologia:** Após o nascimento da prole, 28 ratos *Wistar* (21 dias) foram randomizados em quatro grupos submetidos a 6 meses de dieta (n= 7 por grupo): PPS-DC (prole de pais sedentários submetida à dieta controle); PPT-DC (prole de pais treinados submetida à dieta controle); PPS-DH (prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica) e PPT-DH (prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica). Para analisar as possíveis adaptações musculares e da MEC do músculo gastrocnêmio da prole de pais submetidos ao TF, as seguintes análises moleculares foram efetuadas: (a) atividade das metaloproteinases (MMPs); (b) expressão gênica das proteínas colágeno 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno 3 alfa 1 (COL3A1), fator de crescimento tumoral beta 1 (Tgfb1) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (Ctgf) usando RT-qPCR, (c) proteínas Col1, Nfkb, Ppara através da técnica de Western Blotting. **Resultados:** Observamos que a dieta hiperlipídica diminuiu os níveis de RNAm de colágeno, as vias inflamatórias (Tnfa, Tweak, Il6 e Nfkb) e de atrofia (Foxo1, Atrogin1 e Murf1), assim como os níveis de RNAm do fator de transcrição adipogênico no músculo gastrocnêmio da prole. Por outro lado, o TF paterno aumentou a atividade da MMP-2 e diminuiu os níveis de Il6 na prole submetida à dieta controle. O TF paterno aumentou os níveis de RNAm de P70S6K e Ppara, e diminuiu os níveis de RNAm de Atrogin1, enquanto diminuiu os níveis de proteína Nfkb, Il1b e Il8 na prole submetida a uma dieta hiperlipídica. **Conclusão:** Segundo os resultados obtidos, observa-se que o TF paterno influencia as principais vias de remodelamento do músculo esquelético e perfis inflamatórios importantes para a manutenção da homeostase muscular na prole submetida às dietas controle e hiperlipídica.

**Palavras-chave:** matriz extracelular, músculo esquelético, dieta hiperlipídica, efeitos intergeracionais, treino de força.



## ABSTRACT

**Introduction:** Although some studies demonstrate that the high-fat diet (HFD) promotes adverse effects on muscle extracellular matrix (ECM) remodeling, the mechanisms involved in muscle trophism, inflammation and adipogenesis still remain without further investigation. Thus, we investigated the effects of 8 weeks of paternal resistance training (RT) on the expression/activity of genes and proteins of critical factors involved in muscle inflammation and remodeling of parents and offspring (submitted to a control or HFD). **Objective:** To investigate the effects of paternal RT on molecular adaptations related to skeletal muscle remodeling in offspring submitted to control and HF diets. **Methodology:** After the birth of offspring, 28 *Wistar rats* (21 days old) were randomized into four groups submitted to 6 months of diet (n= 7 per group): SFO-C (offspring from sedentary parents submitted to a control diet); TFO-C (offspring from trained parents submitted to a control diet); SFO-HFD (offspring from sedentary parents on a high-fat diet) and TFO-HFD (offspring from trained parents on a high-fat diet). To analyze the possible muscular and ECM adaptations of the gastrocnemius muscle of the offspring from parents submitted to RT, the following molecular analyzes were performed: (a) activity of metalloproteinases (MMPs); (b) gene expression of collagen 1 alpha 1 (COL1A1), collagen 3 alpha 1 (COL3A1), tumor growth factor beta 1 (Tgfb1) and connective tissue growth factor (Ctgf) proteins using RT-qPCR, (c) Col1, Nfkb, Ppara proteins using the Western Blotting technique. **Results:** We observed that the HFD decreased collagen mRNA levels, inflammatory pathways (Tnfa, Tweak, Il6 and Nfkb) and atrophy (Foxo1, Atrogin1 and Murf1), as well as adipogenic transcription factor mRNA levels in the gastrocnemius muscle of the offspring. On the other hand, paternal RT increased MMP-2 activity and decreased Il6 levels in offspring submitted to control diet. Paternal RT increased P70S6K and Ppara mRNA levels, and decreased Atrogin1 mRNA levels, while decreasing Nfkb, Il1b and Il8 protein levels in offspring submitted to a HFD. **Conclusion:** According to the results obtained, it is observed that paternal RT influences the main skeletal muscle remodeling pathways and important inflammatory profiles for the maintenance of muscle homeostasis in offspring submitted to control and HF diets.

**Keywords:** extracellular matrix, skeletal muscle, high-fat diet, intergenerational effects, resistance training.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática do microambiente no músculo esquelético. A parte esquerda da figura representa as redes e ligações cruzadas das principais proteínas da matriz. A parte direita representa componentes celulares na criação do nicho das células satélites. Os pequenos símbolos representam fatores humorais liberados por diferentes tipos de células. Adaptado de Grzelkowska-Kowalczy (2012)..... 31

**Figura 2.** Representação estrutural da MEC do músculo esquelético. Acima da membrana plasmática, estão as fibras colágenas. Os proteoglicanos estão misturados às fibras de colágeno, encontrados preenchendo a maior parte dos espaços intersticiais da MEC. A fibronectina encontra-se em contato com a integrina. As integrinas estão atravessando a membrana plasmática, ligando a MEC ao citoesqueleto. Adaptado de humanperformanceandhealth.org (2019). ..... 31

**Figura 3.** Ilustração que representa a organização do tecido muscular. O músculo esquelético consiste em fibras musculares circundadas por tecido conjuntivo. A camada que está ao redor do músculo é o epimísio. Os conjuntos de fibras musculares, que são os fascículos, são envoltos pelo perimísio. Ainda, cada fibra muscular é coberta por uma camada fina de tecido conjuntivo, chamada endomísio. Os nutrientes chegam no tecido muscular via vasos sanguíneos. Adjacente às fibras musculares estão as células satélites, precursores da miogênese. Diversas células ocupam os espaços intersticiais do músculo e com as células satélites proporcionam a manutenção do tecido muscular. Adaptado de Sciorati et al. (2016)..... 33

**Figura 4.** Representação esquemática das consequências relacionadas à produção e ativação das MMPs. A regulação da produção da MMP, além do processo de ativação pericelular são demonstrados. A ativação da MMP acarreta a proteólise dos componentes da MEC, liberação de fatores matriciais, modificação da adesão das células à matriz, e alterações no perfil dos receptores à superfície das células. Entretanto, a proteólise excessiva resulta em consequências patológicas e à progressão de diferentes doenças. Nota: PI3K – fosfoinosítídeo 3-quinase ou MAP Quinase; MMP – metaloproteinases de matriz; e MEC – matriz extracelular. Adaptado de Gorman et al. (2011). ..... 36

**Figura 5.** Esquema ilustrando as maiores vias responsáveis por controlar o tamanho da fibra muscular. As linhas pontilhadas representam as vias cujos mecanismos no músculo esquelético adulto ainda precisam ser completamente definidas. Adaptado de: Yoshida; Delafontaine, (2020). ..... 39

**Figura 6.** Representação esquemática da diminuição da Proteína Quinase Dependente de AMP (AMPK), do Co-ativador-1 dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PGC-1 $\alpha$ ), e relação com o desenvolvimento do

fenótipo metabólico presente nas condições de resistência à insulina e obesidade. Adaptado de Liang; Ward (2006). ..... 42

**Figura 7.** Representação esquemática de fatores secretados pelo tecido adiposo com atuação no músculo esquelético e no fígado resultando em resistência à insulina. Adaptado de: Roberts; Hevener; Barnard, (2013). ..... 43

**Figura 8.** Ilustração representativa de uma via bem estabelecida para a atrofia muscular esquelética, envolvendo MuRF1 e MAFbx (Atrogin-1). Observa-se o aumento da expressão dos genes E3 ubiquitina ligase, MuRF1 E MAFbx nas condições de privação de nutrientes, carga externa ou atividade neural, além da exposição do músculo esquelético ao excesso de glicocorticóides ou idade avançada. O aumento da transcrição de MuRF1 ou MAFbx é parcialmente controlado pela ativação de fatores de transcrição Foxo e do receptor de glicocorticóides (GR). O aumento da expressão de MuRF1 e MAFbx acarreta atrofia muscular através de mecanismos bioquímicos que ainda não estão totalmente elucidados. No músculo esquelético de um jovem adulto saudável, a sinalização de insulina IGF-1/Akt e um baixo nível de glicocorticóides inibem a atividade dos fatores de transcrição Foxo. Além disso, a sinalização de insulina/IGF-1 apresenta dupla função, podendo inibir a atrofia, assim como estimular a síntese proteica e a hipertrofia via Akt e mTORC1. Adaptado de Ebert et al.(2019). ..... 45

**Figura 9.** Representação esquemática da sinalização TWEAK/FN14 na miogênese e atrofia muscular. A miogênese pode ser inibida ou estimulada com base na concentração de TWEAK. Quando encontrado em baixas concentrações, TWEAK ativa a via alternativa (NIK/IKK), promovendo a fusão de mioblastos. Em altas concentrações, TWEAK ativa a via clássica (IKKb) para inibir a diferenciação. Além disso, a sinalização TWEAK/Fn14 também pode promover a degradação de proteínas através da ativação de NF- $\kappa$ B via TRAF6 ou NADPH. Adaptado de Zhou et al. (2016) ..... 47

**Figura 10.** As proteínas Akt1 e FOXO momentos antes de induzirem hipertrofia versus atrofia muscular. Akt1 parece ser a força de equilíbrio entre atrofia e hipertrofia. Resumidamente, o IGF-1 e outros estímulos anabólicos ativam a via PI3K-Akt1, levando à ativação de alvos (mTOR e S6K1) que estimulam a síntese de proteínas musculares, ocasionando a hipertrofia. Akt1 também é responsável pelo estado de fosforilação da família FOXO de fatores de transcrição. Quando FOXO é fosforilado por Akt1, deixa o núcleo e se torna inativo, inibindo a indução de atrofia. Se a atividade de Akt1 é suprimida, FOXO torna-se desfosforilado e transcricionalmente ativo, ligando-se diretamente ao gene de ubiquitinação de Atrogin-1, aumentando a degradação proteica e atrofia muscular. Adaptado de Baldwin et al. (2013). ..... 50

**Figura 11.** . Esquema representativo apresentando as vias relacionadas à resistência à insulina ocasionada pelo consumo de dieta hiperlipídica . Adaptado de: Wasserman (2019). ..... 54

**Figura 12.** Representação ilustrativa dos mecanismos relacionados às alterações na MEC do músculo esquelético induzidas pela sobrecarga mecânica. → Representa ativação/estímulo; † representa inibição. As setas cinzas indicam estímulo total de processos que resulta na regulação positiva de vias de sinalização. Adaptado de Grzelkowska-Kowalczyk (2012)..... 60

**Figura 13.** Representação ilustrativa dos eventos epigenéticos que regulam a atividade genética sem alterar a sequência do DNA. Genes diferentes são expressos em função de marcas associadas com a metilação do DNA, assim como através de alterações na estrutura e composição da cromatina. Adaptado de Tibana et al. (2017). ..... 65

**Figura 14.** Representação ilustrativa dos fatores epigenéticos que podem contribuir para o efeito transgeracional do exercício a longo prazo no fenótipo da prole. O período crônico do exercício pode afetar o metabolismo e o eixo hipotálamo-hipófise-testículo nos pais, causando epimutações durante a espermatogênese. Provavelmente, as epimutações incluem a metilação do DNA, alterações nas histonas e RNAs não codificantes nas células germinativas masculinas, podendo resultar na alteração do fenótipo na prole. Adaptado de Murashov et al. (2016). ..... 66

**Figura 15.** Desenho experimental. Ilustração esquemática das etapas metodológicas do presente estudo. Adaptado de Sousa Neto (2021). ..... 79

**Figura 16.** Representação ilustrativa da eletroforese, uma das etapas da técnica de Zimografia segundo Iwai et al. (2008). Amostras do músculo gastrocnêmio extraídas do modelo animal e 10 µL de tampão de corrida inseridos nas cubas específicas para eletroforese. .... 84

**Figura 17.** Proteínas da matriz estrutural, enzimas de remodelamento da matriz e fator de crescimento. Níveis de RNAm no músculo gastrocnêmio de pais e filhos submetidos às dietas controle e hiperlipídica. Os dados utilizam o erro padrão da média geométrica. O ..... 93

**Figura 18.** Níveis de RNAm das vias de síntese e atrofia no músculo esquelético dos pais e da prole submetida às dietas controle e hiperlipídica. Os dados estão expressos em média geométrica ± erro padrão. Os níveis de expressão são representados por  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . **(A, B)** Proteína quinase B (Akt1). **(C, D)** Proteína determinante de mioblastos 1 (Myod). **(E, F)** Proteína ribossomal S6 quinase beta ..... 96

**Figura 19.** Vias inflamatórias, fator de transcrição adipogênico e fator de transcrição regulador dos níveis de RNAm do metabolismo lipídico no gastrocnêmio de pais e proles, submetidas às dietas controle e hiperlipídica **(A, B)**. Fator de necrose tumoral alfa (Tnfa). **(C, D)** Membro 12 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral (Tweak). **(E, F)** Interleucina-6 (IL6). **(G, H)** Fator nuclear kappa B (Nfkb). **(I, J)** CCAAT/proteína de ligação ao intensificador (Cebpa). **(K, L)** Receptor ativado por proliferador de peroxissoma (Ppara). SF:

Pais sedentários; TF: Pais treinados; SF-C: Prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TF-O: Prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HFD: Prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HFD: Prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Os dados são o erro padrão da média geométrica. O nível de expressão é representado pelo  $2^{\Delta\Delta CT}$ . PS, pais sedentários; PT, pais treinados; PPS-DC, prole de pais sedentários submetida à dieta controle; PPT-DC, prole de pais treinados submetida à dieta controle; PPS-DH, prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; PPT-DH, prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Diferenças estatisticamente significativas em relação a: <sup>a</sup>PPS-DC; <sup>b</sup>PPT-DC; <sup>c</sup>PPS-DH,  $p < 0,05$  (n= 7 por grupo). ..... 99

**Figura 20.** Níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio de pais e proles submetidos às dietas controle e hiperlipídica. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **(A, B)** Interleucina-1b (IL-1b). **(C, D)** Interleucina-6 (IL-6). **(E,F)** Interleucina-8 (IL-8). **(G,H)** Interleucina-10 (IL-10). **(I, J)** Interleucina-12 (IL-12). **(K, L)** Fator de necrose tumoral alfa (Tnf- $\alpha$ ). SF, pais sedentários; TF, pais treinados; SFO-C, prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TFO-C, prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HF, prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HF, prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n= 7 por grupo). ..... 102

**Figura 21.** Efeitos das dietas controle e hiperlipídica nas proles de pais treinados e sedentários sobre a atividade das bandas pró (latente) e ativa da MMP-2 no gastrocnêmio. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. PPS-DC = prole de pais sedentários submetida à dieta controle; PPT-DC = prole de pais treinados exposta à dieta controle; PPS-DH = prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; PPT-DH = prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n= 7 por grupo). Diferença significativa comparado: <sup>a</sup>PPT-DC x PPS-DC; <sup>b</sup>PPT-DH x PPT-DC,  $p < 0,05$ . ..... 104

**Figura 22.** Níveis de expressão do Colágeno tipo I, Nfkb e Ppara no músculo gastrocnêmio dos pais e das proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica. Os dados são expressos em média  $\pm$  DP. **(A)** Níveis de expressão do Col1/Gapdh nos pais. **(B)** Níveis de expressão proteica de Col1/Gapdh na prole. **(C)** Níveis de expressão proteica de Nfkb/Gapdh nos pais. **(D)** Níveis de expressão proteica de Nfkb/Gapdh na prole. **(E)** Níveis de expressão proteica de Ppara nos pais. **(F)** Níveis de expressão proteica de Ppara na prole. SF, Pais sedentários; PT, Pais treinados; SFO-C, Prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TFO-C, Prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HF, Prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HF, Prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n = 7 por grupo). ..... 106

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição das dietas usadas no protocolo experimental ..... 82

**Tabela 2.** Lista dos genes alvos associados à matriz extracelular, inflamação, metabolismo e miogenese:..... 86

**Tabela 3.** Trajetória do crescimento da prole..... 89

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Actb	<i>Actin beta</i> (Beta Actina)
Akt 1-3	<i>Protein kinase B (PKB)</i> (Proteína quinase B 1-3)
Akt/mTOR	<i>Protein kinase B (PKB)/ mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway</i> (Via da Proteína quinase B/Proteína alvo da rapamicina em mamíferos)
ANCP	Antígeno Nuclear da Célula em Proliferação
Atrogin-1	<i>Atrogin-1</i> (Atrogina-1)
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CCN2	<i>Cellular Communication Network Factor 2</i> (Fator de crescimento do tecido conjuntivo 2)
Cebpa	<i>CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha</i> (Proteína alfa de ligação ao CCAAT)
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
COL3	<i>Collagen, type 3</i> (Colágeno tipo III)
COL6	<i>Collagen, type 6</i> (Colágeno tipo VI)
COL1A1	<i>Collagen 1, alpha 1</i> (Colágeno tipo I, alfa 1)
COL3A1	<i>Collagen 2, alpha 1</i> (Colágeno tipo III, alfa 1)
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
Ctgf	<i>Connective tissue growth factor</i> (Fator de crescimento do tecido conjuntivo)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> (Quinase de adesão focal)
FGF	<i>The fibroblast growth factor</i> (Fator de crescimento fibroblástico)
Foxo1	<i>Forkhead Box 1</i> (Fator de Transcrição de Forquilha)
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GDF-8	<i>Growth differentiation factor 8</i> (Miostatina)
Glut4	<i>Insulin responsive glucose transporter</i> (Transportador de glicose insulino-sensível)
HK2	<i>Hexokinase 2</i> (Hexoquinase 2)
H19	<i>Imprinted maternally expressed transcript</i> (transcrição impressa da maternidade).
H3K4	Histona-3 lisina-4
H3K4me	Trimetilação da histona-3 lisina-4
Igf1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina)
Igf1/Akt/mTOR	<i>insulin-like growth factor-1/Protein Kinase B/ mammalian target of rapamycin pathway</i> (Via do Fator de crescimento dependente de insulina/Proteína quinase B/Alvo da rapamicina em mamíferos)
Igf1/Foxo/mTOR	<i>insulin-like growth factor-1/ Members of the class O of forkhead box transcription factors/Mammalian target of rapamycin pathway</i> (Via do Fator de crescimento dependente de insulina/Fatores de crescimento de forquilha/Alvo da rapamicina em mamíferos)
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor-<math>\kappa</math>B (I<math>\kappa</math>B) kinase (IKK)</i> (Inibidor do fator nuclear kappa beta)



IkB $\alpha$	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> (Fator nuclear do potencializador do gene do polipeptídeo leve kappa no inibidor de células B, alfa)
IKK/Nfkb	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> (Fator nuclear do potenciador do gene do polipeptídeo leve kappa no inibidor de células B, alfa)  <i>Inhibitor of nuclear factor-<math>\kappa</math>B (I<math>\kappa</math>B) kinase (IKK)/ nuclear factor kappa B pathway</i> (Via Inibidor do fator nuclear kappa beta quinase/Fator nuclear kappa beta)
Il1	<i>Interleukin 1</i> (Interleucina-1)
Il6	<i>Interleukin 6</i> (Interleucina-6)
Il8	<i>Interleukin 8</i> (Interleucina-8)
Il12	<i>Interleukin 12</i> (Interleucina-12)
Ilb1	<i>Interleukin <math>\beta</math>1</i> (Interleucina- $\beta$ 1)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitogênio)
MEC	<i>Extracellular Matrix</i> (Matriz extracelular)
MEF2A	<i>Myocyte Enhancer Factor 2A</i> (Fator estimulador específico para miócitos 2A)
micro-RNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> (Micro ácido ribonucleico)
Micro-RNA-494	<i>Micro ribonucleic acid 494</i> (Micro ácido ribonucleico 494)
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i> (Metaloproteinase de matriz-2)
MRF	<i>Myogenic regulatory factors</i> (Fatores regulatórios miogênicos)
MRF4	<i>Myogenic regulatory factor 4</i> (Fator regulatório miogênico 4)

mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Alvo da rapamicina em mamíferos)
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i> (Mecanismo Alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1)
Murf1	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i> (Fator miogênico 5)
MyoD	<i>Myoblast determination protein 1</i> (Proteína 1 para determinação de mioblastos)
OGA	GlcNAcase
OGT	<i>O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase</i> ( $\beta$ -N-acetilglucosamina transferase ligada ao O)
PDK4	<i>Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4</i> (Piruvato desidrogenase quinase)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado das plaquetas)
Pgc1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator</i> (Co-ativador de transcrição gênica 1 $\alpha$ )
Ppard	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta</i> (Proliferador de peroxissomo ativado por receptor delta)
PPARGC1A	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> (Co-ativador de transcrição gênica 1 $\alpha$ )
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-quinases)

PI3K/Akt/mTOR/P70S6K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B/Mammalian target of rapamicin/ Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i> (Via Fosfatidilinositol 3-quinase/Proteína quinase B/Proteína alvo da rapamicina em mamíferos/ Proteína ribossômica S6 quinase beta-1)
P70S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i> (Proteína ribossômica S6 quinase beta-1)
Pparγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama)
pró-MMP	<i>Pro-matrix metalloproteinase-2</i> (Pró-metaloproteinase-2 de matriz)
PTPN1	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1</i> (Proteína tirosina fosfatase 1)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNA <sub>m</sub>	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucleico transportador
RNA <sub>t</sub> -Gli-CCC	Ácido ribonucleico transportador – Glicina – Prolina
RNA <sub>t</sub> -Gli-GCC	Ácido ribonucleico transportador – Glicina - Alanina
RNA <sub>t</sub> -His-GTC	Ácido ribonucleico transportador - Histidina – Glutamina
RPLP0	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i> (Proteína ribossômica ácida 60S P0)

SCD1	<i>Stearyl-CoA desaturase 1</i> (Dessaturase de estearoil-CoA 1)
SLC2A	<i>Solute carrier family 2, member 1</i> (Família do transportador de soluto 2, membro 1)
SMAD2	SMA ("pequeno" verme fenótipo) e <i>Drosophila</i> MAD ("Mães contra decapentaplégico") 2
TFAM	<i>Transcription Factor A, Mitochondrial</i> (Fator de transcrição mitocondrial A)
Tgfb1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> (Fator de crescimento tumoral beta 1)
TIMP-1	<i>Metallopeptidase inhibitor 1</i> (Inibidor de metalopeptidase 1)
TIMP-2	<i>Metallopeptidase inhibitor 2</i> (Inibidor de metalopeptidase 2)
Tnfa	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
Tweak	<i>Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i> (Membro 12 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral, também conhecido como indutor fraco de apoptose relacionado ao TNF)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)
Zn <sup>2+</sup>	Zinco
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i> (Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 1)

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
2.1 MATRIZ EXTRACELULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO (MEC).....	29
2.1.1 CONSTITUINTES, SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA MEC.....	29
2.1.2 FATORES DE CRESCIMENTO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	37
2.1.3 FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA MEC E REGULADORES MIOGÊNICOS.....	39
2.1.4 MIOCINAS.....	42
2.1.5 PROTEÍNAS E VIAS RELACIONADAS À ATROFIA MUSCULAR.....	43
2.1.6 PROTEÍNAS E VIAS RELACIONADAS A HIPERTROFIA MUSCULAR.....	47
2.1.7 REGULADORES E VIAS DE INSULINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	51
2.2 DIETA HIPERLIPÍDICA E SEUS EFEITOS DELETÉRIOS NA MEC MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	53
2.3 TREINAMENTO DE FORÇA E MATRIZ EXTRACELULAR NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	59
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO PATERNO COMO AGENTE INTERGERACIONAL MODULANDO O MÚSCULO ESQUELÉTICO DA PROLE.....	64
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>74</b>
<b>4. HIPÓTESE.....</b>	<b>75</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
6.1 PAIS:.....	77
6.2 PROLE:.....	77
6.3 TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO:.....	80
6.4 CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E MASSA CORPORAL DA PROLE:.....	81
6.5 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS:.....	82
6.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPS POR ZIMOGRAFIA:.....	82
6.7 EXTRAÇÃO DO RNAM E RT-QPCR:.....	84
6.9 ANÁLISE DE DADOS:.....	88
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
7.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO TF PATERNO NO GANHO DE PESO CORPORAL E NO ÍNDICE DE ADIPOSIDADE DA PROLE.....	89

7.2 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E TF PATERNO EM PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DA MEC, ENZIMAS DE REMODELAMENTO DA MATRIZ E NÍVEIS DE RNAM DOS FATORES DE CRESCIMENTO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO.....	92
7.3 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E TF PATERNO NOS NÍVEIS DE RNAM DAS VIAS DE SÍNTESE E ATROFIA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO.....	95
7.4 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E TF PATERNO NAS VIAS INFLAMATÓRIAS, FATORES DE TRANSCRIÇÃO ADIPOGÊNICOS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO REGULADORES DOS NÍVEIS DE RNAM DO METABOLISMO LIPÍDICO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO .....	98
7.5 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO TF PATERNO NAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E ANTIINFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO .....	101
7.6 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E TF PATERNO NA ATIVIDADE DA MMP-2 NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO .....	103
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>115</b>
<b>11. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>116</b>
<b>12. IMPACTOS PRÁTICOS DOS ACHADOS PARA A SOCIEDADE .....</b>	<b>117</b>
<b>13. ATIVIDADES/PRODUTOS DESENVOLVIDAS(OS) DURANTE O MESTRADO .....</b>	<b>118</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO 1 – ARTIGO NA ÍNTEGRA .....</b>	<b>141</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O treinamento de força (TF) é considerado uma modalidade popular e eficaz de exercício que objetiva melhorar a função muscular e o desempenho funcional, assim como parâmetros de saúde. O músculo vem sendo reconhecido como primordial para a manutenção adequada da saúde, considerando o movimento e a postura, além de um regulador do *crosstalk* inter-órgãos para o metabolismo de energia e proteínas corporais (BENITO et al., 2020). Considerando os resultados esperados do TF, destaca-se o aumento no volume e força muscular, imprescindíveis para indivíduos e clínicos que visam desempenho, saúde e melhoria funcional (LOPEZ et al., 2021). Nesse sentido, prevenir a perda de massa muscular esquelética deve ser um ponto-chave para a promoção e manutenção geral da saúde (LOPEZ et al., 2021).

Durante a prática do exercício físico, as demandas impostas ao músculo esquelético são responsáveis pela sinalização intra e intercelular, fundamentais para a adaptação ao exercício (HAWLEY et al., 2014). Além disso, há evidências que salientam a ocorrência de extenso remodelamento da matriz extracelular (MEC) muscular esquelética durante a regeneração muscular após o exercício. Um dos mecanismos responsáveis por esse processo é o aumento da expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pelo remodelamento da matriz (FERNANDES; PAULA; SOCI, 2008; VAN DER HEIJDEN et al., 2015). A MEC do músculo esquelético compreende o espaço entre as fibras musculares. Funciona como suporte estrutural, assim como um meio de interação e sinalização celular (GILLIES; LIEBER, 2011). É constituída por proteínas estruturais e adesivas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Kjaer et al. (2004) mostraram que o exercício físico é capaz de estimular a expressão de genes relacionados ao remodelamento da matriz. Ratificando tal achado, Xiaoping et al. (2009) mostraram que a lesão muscular esquelética estimula o aumento da expressão dos genes colágeno 1, alfa 1 (COL1A1) e colágeno 3, alfa 1 (COL3A1), respectivamente colágeno tipo I e colágeno tipo III. Nesse mesmo trabalho, também foi observado o aumento da expressão da metaloproteinase 2 (MMP-2) e do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2), proteínas responsáveis pela modulação da síntese e degradação das moléculas de

colágeno. Fatores de crescimento, como o fator de crescimento do tecido conjuntivo (Ctgf), responsáveis pela regulação de proteínas estruturais, também são regulados positivamente e estimulam a síntese do colágeno tipo I e outras proteínas da MEC através do estímulo mecânico ocasionado pelo exercício físico, enquanto o fator de crescimento tumoral beta 1 (Tgfb1) possui atividade fibrótica e inibe a miogênese (CENCETTI et al., 2013).

Estudos mostram que a dieta hiperlipídica é responsável pelo desequilíbrio da homeostase na MEC, alterando a expressão de genes relacionados ao remodelamento. Quando há aumento do tecido adiposo, citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 (Il1) e 6 (Il6), e o fator de necrose tumoral alfa (Tnfa) são liberadas na corrente sanguínea. Essas citocinas estimulam a expressão dos genes que sintetizam colágeno no músculo esquelético, como COL1A1 e COL3A1. Paralelamente, o perfil inflamatório diminui a expressão gênica da MMP-2 e altera a homeostase com os seus inibidores teciduais, os TIMPs. Com isso, há um desequilíbrio entre síntese e degradação de colágeno, proporcionando um perfil intramuscular pró-fibrótico (CARMELI et al., 2004; CESARI et al., 2005). Nesse contexto, Sitnick; Bodine; Rutledge (2009) demonstraram pela primeira vez que a exposição crônica de camundongos jovens a uma dieta hiperlipídica durante 14 semanas atenuou o crescimento muscular esquelético em resposta a um aumento de carga imposta ao tecido muscular, presente no TF. Nesse estudo, o músculo plantar (predominantemente glicolítico, com boa resposta à hipertrofia) dos camundongos respondeu com o crescimento significativamente impactado mediante a sobrecarga funcional. Ainda, camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por um período mais longo (30 semanas), e depois submetidos ao TF, apresentaram uma falha completa de crescimento em resposta ao estímulo. A resposta de crescimento atenuado nos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica foi associada a uma diminuição na ativação de Akt e seu alvo S6K1. Os dados apresentados sugerem que o consumo crônico da dieta hiperlipídica interferiu na sinalização celular envolvida na resposta muscular ao aumento da carga, diminuindo a ativação das vias de síntese proteica. No entanto, os mecanismos responsáveis pela resposta celular alterada mediante o estímulo de sobrecarga presente no TF ainda são desconhecidos. A diminuição da sinalização de Akt/mTOR sugeriu que os camundongos alimentados com dieta



hiperlipídica apresentaram falha na ativação adequada da iniciação de tradução proteica, resultando na diminuição da síntese de proteínas e no crescimento muscular, consequências do TF.

Por outro lado, considerando as vias de sinalização de atrofia e hipertrofia muscular relevantes, o fator de transcrição Nfkb é considerado primordial para a indução da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias que participam da atrofia muscular esquelética, tais como o Tnfa, Ilb1, Il6, Il8 e Il12. O Nfkb é encontrado regulado positivamente em diferentes condições de catabolismo decorrentes do aumento do sistema ubiquitina-proteassoma e autofagia (ABRIGO et al., 2016; DEMASI; LAURINDO, 2012). Ropelle et al. (2006), realizaram um estudo cuja amostra foi dividida em três grupos (ratos alimentados com dieta controle, ratos obesos alimentados com dieta obesogênica durante 3 meses, e ratos obesos alimentados com dieta obesogênica submetidos ao exercício físico), mantendo três meses de consumo de dieta hiperlipídica. Como resultado, obtiveram a diminuição dos níveis de Ikb $\alpha$  (membro de uma família de proteínas celulares que funcionam para inibir o fator de transcrição Nfkb) em ratos, indicando a ativação da via IKK/Nfkb, uma das responsáveis pela atrofia muscular esquelética.

Quanto a Il6, é importante destacar que a resposta dessa citocina ao exercício pode ter uma grande contribuição na função metabólica. A Il6 plasmática aumenta de forma diretamente proporcional ao tempo e à dose do exercício (MUNÓZ-CÁNOVES, 2013). Há também um papel hormonal da Il6 liberada pelo músculo esquelético durante o exercício. Assim, as fibras musculares em contração produzem e liberam Il6 de maneira endócrina para facilitar a mobilização do substrato do fígado e do tecido adiposo (KELLER, 2006). A estimulação das células musculares esqueléticas através de substâncias inflamatórias, ou as citocinas pró-inflamatórias como o Tnfa resulta na liberação de Il6, evidenciando que os miócitos também são capazes de produzir essa citocina em resposta aos estímulos inflamatórios (MUNÓZ-CÁNOVES, 2013; KELLER, 2006).

Além da indução de inúmeras citocinas pró-inflamatórias relacionadas à atrofia, a condição inflamatória também acarreta impactos negativos no remodelamento do músculo esquelético, cooperando para o surgimento de desordens musculares (TAM et al., 2015). Surpreendentemente, Brown et al.

(2015) foram os pioneiros a investigarem a via de sinalização Akt na condição de resposta efetada no período inicial da regeneração muscular esquelética. Esse estudo envolveu 48 camundongos com três semanas de vida, randomizados nos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica, submetidos a 12 semanas de dieta. Nele, os autores observaram a resposta inflamatória reduzida em camundongos obesos no nível de indução de Tnfa. Além disso, a expressão de Il6 diminuiu no músculo dos animais, sendo essa interleucina responsável pelo recrutamento e infiltração de fagócitos para o local da lesão durante a regeneração do músculo esquelético. Aparentemente, o recrutamento e infiltrado de macrófagos podem estar desregulados, justificando a razão pela qual a IL-6 é descrita como elevada sistemicamente e a indução encontra-se diminuída no músculo esquelético. Solidificando esses registros, Zhang et al. (2013) e Nguyen; Cheng; Koh, (2011) observaram, respectivamente, a diminuição no recrutamento de macrófagos em camundongos obesos nocaute para Il6, e a diminuição de macrófagos no músculo de camundongos obesos durante a regeneração. Aparentemente, a sinalização de Il6 encontra-se alterada em ratos obesos.

De uma forma geral, as adaptações na musculatura esquelética são um processo de grande complexidade que abarca a ligação de diversos mecanismos regulatórios e vias intracelulares (FRANCHI; REEVES; NARICI, 2017). O TF é considerado um mediador de lipólise, responsável por prevenir a expansão lipídica no interior do músculo esquelético. Esse processo é ligado ao mecanismo mediador Ppar $\gamma$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$ , um membro do receptor hormonal nuclear que leva à diferenciação dos adipócitos) (RIBEIRO et al., 2017). Além disso, o TF proporciona efeitos benéficos ao músculo esquelético a partir dos fatores de transcrição adipogênicos (CCAAT - família de fatores de transcrição compostos por seis membros, denominados de Cebpa), suprimindo fatores pró-inflamatórios (Guedes et al., 2020), assim como o remodelamento disfuncional da MEC (GUZZONI et al., 2018). Ademais, o TF protege contra a atrofia muscular decorrente da obesidade através da ativação do eixo anabólico, que envolve Igf1, Akt, P70S6K e MyoD (GLOVER; PHILLIPS, 2010).

Atualmente, o fato do TF paterno realizado antes da concepção proporcionar e mediar efeitos protetivos na prole de forma epigenética, representa um potencial modulador de benefícios intergeracionais e uma

estratégia custo-efetiva eficaz para proteger a saúde da primeira geração da prole submetida à dieta hiperlipídica (VIEIRA DE SOUSA NETO et al., 2021). Nesse contexto, o comportamento paterno é capaz de modular reguladores fundamentais responsáveis pelo remodelamento muscular esquelético da prole. O termo “epigenética” é caracterizado como modificações do genoma que são herdadas pelas próximas gerações, por exemplo, pais em relação aos seus filhos, sem causar alterações na sequência do DNA. Embora não se tenha uma relação com mutações na sequência do DNA, estudos mostram que fatores ambientais como dieta, estresse e, principalmente, exercício físico podem modular eventos moleculares que modificam a conformação do DNA e da cromatina, podendo regular a expressão gênica, a expressão proteica e a atividade enzimática de diversos tecidos presentes no organismo (WADDINGTON, 2012; ZIMMER; BLOCH, 2015). A metilação do DNA e o perfil de micro-RNAs são os mecanismos intergeracionais mais consolidados na literatura, enquanto outros processos moleculares podem ser relevantes no contexto da linhagem paterna. Essa variedade de modificações no perfil epigenético pode alterar a estrutura da cromatina ou recrutar cofatores transcripcionais para o DNA, a fim de regular a expressão gênica, o que, conseqüentemente, pode alterar a expressão de proteínas e a atividade de enzimas no músculo esquelético da prole (TIBANA et al., 2017; WIDMANN; NIESS; MUNZ, 2019; ZIMMER; BLOCH, 2015).

Murashov et al. (2016) mostraram que modificações no genoma herdadas pela prole podem ser adquiridas utilizando o exercício. Nesse estudo, foi observado que o treino aeróbio utilizando a corrida voluntária na roda ( $7,1 \pm 0,3$  km/dia) realizado por ratos durante 12 semanas e antes da fecundação, modulou a expressão dos genes OGT ( $\beta$ -N-acetilglucosamina transferase ligada ao O), OGA (O-GlcNAcase), PDK4 (piruvato desidrogenase quinase 4), SLC2A (família do transportador de soluto 2, membro 1), Glut4 (transportador de glicose insulino-sensível) e PTPN1 (proteína tirosina fosfatase 1), que estão relacionados com o metabolismo do músculo esquelético, bem como metilação de um gene-chave que regula negativamente o peso corporal, o H19 (transcrição impressa da maternidade). No grupo controle, houve hipermetilação desse gene, enquanto foi observada hipometilação no grupo treinado. Essas alterações epigenéticas na expressão de genes no tecido muscular esquelético e micro-RNAs

demonstram que o exercício físico realizado pelo pai antes da fecundação altera o fenótipo metabólico da prole, auxiliando na redução do peso corporal e melhorando o desempenho muscular metabólico. Já Krout et al. (2018) demonstraram que o treinamento paterno realizado durante 2 semanas (corrida voluntária na roda) aumentou a expressão das vias de sinalização da insulina no músculo esquelético da prole, o que potencialmente promoveu melhora do remodelamento intramuscular por ter melhorado o sistema energético. Ainda, um estudo recente realizado por Stanford et al. (2018) indicou que o exercício paterno voluntário (corrida voluntária na roda) suprimiu os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica sobre a prole, reduzindo os efeitos prejudiciais relacionados a tolerância à glicose, massa gorda e captação de glicose em diferentes músculos esqueléticos, mostrando que o exercício aeróbio é eficaz para reverter os efeitos deletérios ocasionados pela dieta hiperlipídica em genes relacionados ao metabolismo do músculo esquelético.

A literatura relacionada à prole cujo pai realizou exercícios físicos antes da fecundação é limitada (Murashov et al., 2016; Yin et al., 2013), porém a má qualidade da alimentação e sedentarismo existentes antes da fecundação, são bem mais explorados do que as potenciais estratégias a serem realizadas pelo pai, como a realização de exercício físico de forma protetiva para a geração seguinte (MCPHERSON et al., 2014; ROSENFELD, 2017). Estudos prévios mostram que o TF é capaz de aumentar a massa muscular, oxidar ácidos graxos, manter ou aumentar o gasto energético durante o repouso e diminuir a gordura corporal (DELLA GATTA et al., 2014). Interessantemente, estudos publicados recentemente por nosso laboratório também mostraram que o TF pode atuar como uma ferramenta potencial na proteção intergeracional contra condições adversas no músculo cardíaco e no tendão, através da regulação de fatores epigenéticos globais, nas proles submetidas à dieta hiperlipídica (SOUSA NETO et al., 2020a; SOUSA NETO et al., 2020b). Corroborando com estes achados, Krout et al. (2018) também mostraram que o exercício pode reduzir o risco da prole desenvolver doenças metabólicas e herdar os fatores de risco relacionados ao ganho de peso, que são transmitidos pelos pais para a prole de ambos os sexos.

O perfil inflamatório decorrente do consumo da dieta hiperlipídica proporciona alterações na síntese proteica do músculo esquelético, tendo como

consequência alterações funcionais. Quando consideramos o ser humano, tais alterações na função muscular esquelética podem gerar prejuízos na execução das atividades de vida diária do indivíduo, além de predispor a acidentes como quedas dentro e fora do ambiente domiciliar. Como consequência, há impacto na qualidade de vida do indivíduo, bem como aumento dos gastos públicos. Nesse contexto, o TF é uma ferramenta não farmacológica de baixo custo capaz de minimizar ou reverter os efeitos deletérios causados pela dieta hiperlipídica, já que promove o remodelamento da MEC; como também aumenta a síntese de proteínas contráteis, a ativação das células satélites, a área das miofibrilas, o diâmetro da fibra muscular e a capilarização.

Há vários registros na literatura sobre os efeitos do exercício aeróbio paterno em genes metabólicos no músculo esquelético da prole. No entanto, ainda são limitadas as informações sobre como o TF paterno poderá promover efeitos benéficos sobre o remodelamento no tecido muscular esquelético das proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica, o que confere grande relevância ao presente estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Matriz extracelular do músculo esquelético (MEC)

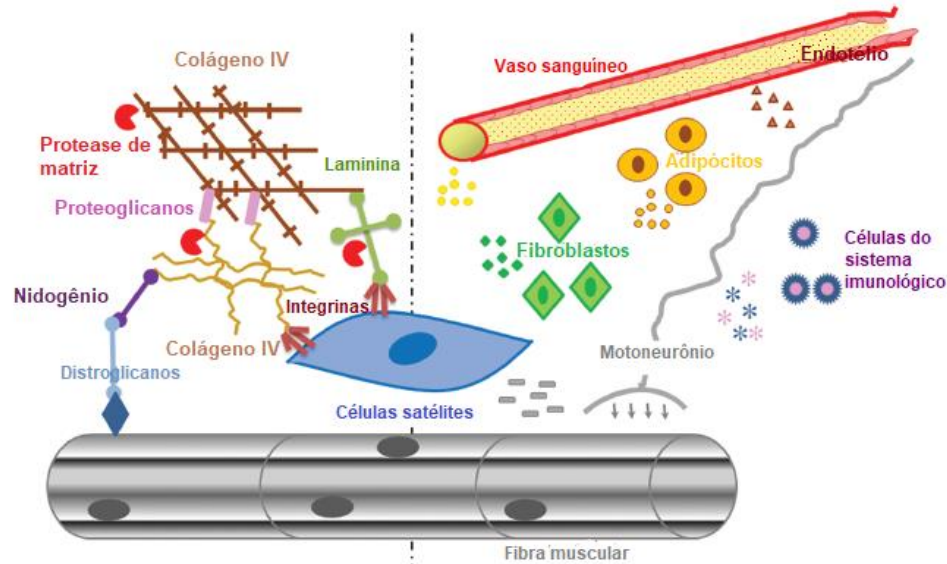
#### 2.1.1 Constituintes, Síntese e Degradação da MEC

A MEC é um dos componentes do tecido conjuntivo caracterizado como uma matriz intersticial que compreende todo o espaço entre as fibras musculares. É um sistema dinâmico que sofre modificações, degradação e reestruturação (TRAPPMANN et al., 2012). Funciona como um suporte estrutural de estabilização, bem como um meio de interação e sinalização celular. As vias de sinalização intracelular e o rearranjo do citoesqueleto (Figuras 1 e 2) ocorrem mediante a interação entre a matriz e as proteínas adesivas (BLOCH et al., 2002).

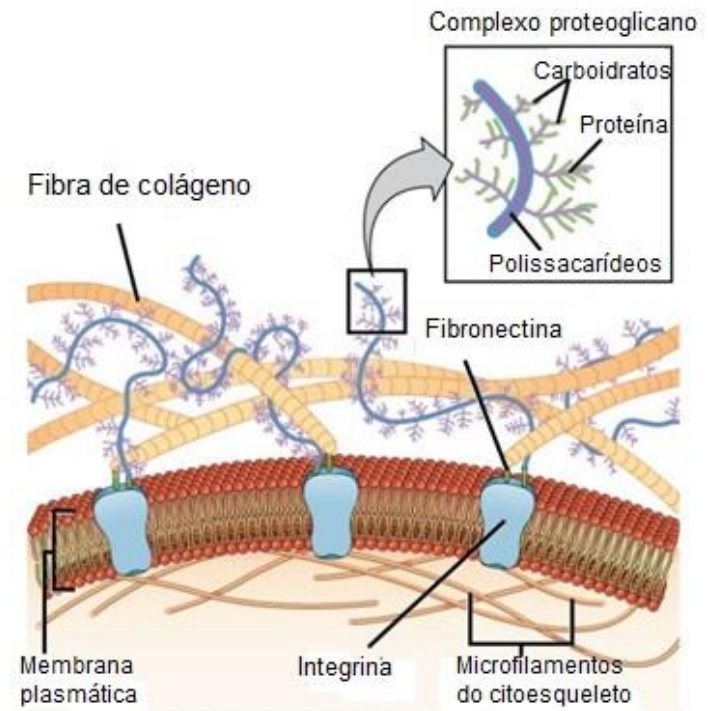
A comunicação entre as fibras musculares e os componentes da MEC é realizada através das integrinas, proteínas transmembranares que apresentam um domínio extracelular que se fixa aos componentes da MEC, e um domínio citoplasmático que se liga à actina do citoesqueleto. A comunicação entre as fibras musculares e os componentes da MEC é realizada através das integrinas, proteínas transmembranares que apresentam um domínio extracelular que se fixa aos componentes da MEC, e um domínio citoplasmático que se liga à actina do citoesqueleto. As integrinas correspondem às maiores estruturas do complexo de adesão da membrana celular envolvendo a MEC e o citoesqueleto. Nesse caso, desempenham a função de transmitir estímulos de dentro para fora das células e vice-versa. São consideradas sensores de tensão localizados na superfície celular. Evidências demonstraram que as integrinas podem converter estímulos mecânicos em respostas celulares adaptativas (CARSON; WEI, 2005).

Esta interação célula-matriz pode ocorrer entre os mioblastos (célula precursora da fibra muscular) e componentes da matriz tais como colágeno, fibronectina e laminina, incluindo integrinas (no domínio citoplasmático da subunidade- $\beta$ ), como demonstrado nas Figuras 1 e 2, para dar suporte ao tecido. Interessantemente, estudos mostram que o bloqueio dessas interações pode

inibir a diferenciação das fibras musculares esqueléticas (BRAKEBUSCH et al., 2002; KJÆR, 2004).



**Figura 1.** Representação esquemática do microambiente no músculo esquelético. A parte esquerda da figura representa as redes e ligações cruzadas das principais proteínas da matriz. A parte direita representa componentes celulares na criação do nicho das células satélites. Os pequenos símbolos representam fatores humorais liberados por diferentes tipos de células. Adaptado de Grzelkowska-Kowalczy (2012).



**Figura 2.** Representação estrutural da MEC do músculo esquelético. Acima da membrana plasmática, estão as fibras colágenas. Os proteoglicanos estão misturados às fibras de colágeno, encontrados preenchendo a maior parte dos espaços intersticiais da MEC. A fibronectina encontra-se em contato com a integrina. As integrinas estão atravessando a membrana plasmática, ligando a MEC ao citoesqueleto. Adaptado de humanperformanceandhealth.org (2019).



As integrinas correspondem às maiores estruturas do complexo de adesão da membrana celular envolvendo a MEC e o citoesqueleto. Nesse caso, desempenham a função de transmitir estímulos de dentro para fora das células e vice-versa. São consideradas sensores de tensão localizados na superfície celular. Evidências demonstraram que as integrinas podem converter estímulos mecânicos em respostas celulares adaptativas (CARSON; WEI, 2005).

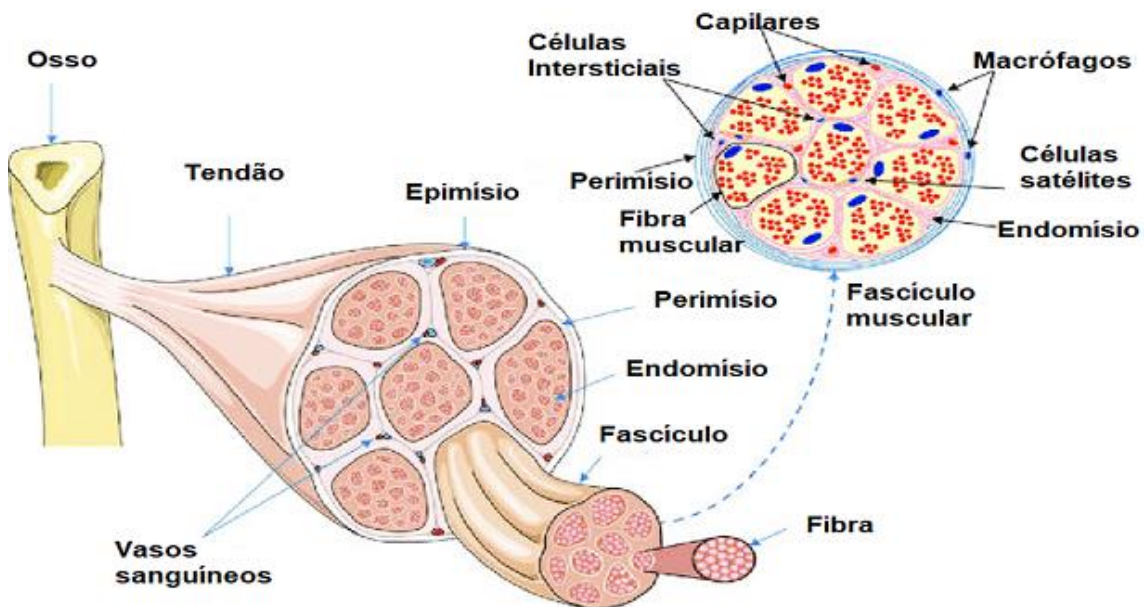
Os ligantes desses receptores localizados na MEC são o colágeno, fibronectina e laminina. Já foi previamente evidenciado que a expressão de diversos outros componentes da MEC é regulada pelo nível da sobrecarga mecânica, promovendo o remodelamento muscular e manutenção da integridade da matriz intramuscular (CHIQUET et al., 2003).

Vários processos estão relacionados à integridade da MEC, como manutenção geral da estabilidade e elasticidade do tecido muscular; transdução mecânica da força contrátil; acoplamento citoesquelético para permitir a execução eficiente dos ciclos frequentes de excitação-contração-relaxamento; meio de incorporação de constituintes celulares como fibras contráteis, capilares, neurônios motores e conjuntos de células satélites; fornecimento de vias de sinalização na periferia da fibra; suporte físico e preservação da homeostase neuromuscular (GILLIES; LIEBER, 2011; WATT; HUCK, 2013).

Além da integridade da MEC, a homeostase é fundamental para a manutenção do tecido muscular esquelético. A homeostase da MEC representa o equilíbrio entre síntese e degradação de seus componentes, tendo em vista que a regulação desta impacta na função muscular (GILLIES; LIEBER, 2011). O remodelamento muscular depende de alterações em sua estrutura e metabolismo, como organização e estrutura das MMPs e seus inibidores teciduais, os TIMPs, e biossíntese de colágeno na matriz (CARMELI et al., 2005).

A MEC é predominantemente formada por colágeno, organizado em fascículos e fibras que contribuem para a transmissão de força. Mais de 90% do colágeno expresso na MEC do músculo esquelético são compostos pelos tipos I, III e IV (KANG et al., 2011). Enquanto o tipo IV predomina na membrana basal, os colágenos tipos I e III (e alguns do tipo V) predominam no epimísio, perimísio e endomísio (KANG et al., 2011), e representam as maiores estruturas proteicas na MEC do músculo esquelético, sendo consideradas fundamentais para a estrutura e sustentação. São importantes membros da matriz e transmitem a

força das fibras musculares, bem como promovem maior resistência ao tecido muscular (PEVIANI et al., 2018). Essas estruturas são representadas na Figura 3:



**Figura 3.** Ilustração que representa a organização do tecido muscular. O músculo esquelético consiste em fibras musculares circundadas por tecido conjuntivo. A camada que está ao redor do músculo é o epimísio. Os conjuntos de fibras musculares, que são os fascículos, são envoltos pelo perimísio. Ainda, cada fibra muscular é coberta por uma camada fina de tecido conjuntivo, chamada endomísio. Os nutrientes chegam no tecido muscular via vasos sanguíneos. Adjacente às fibras musculares estão as células satélites, precursores da miogênese. Diversas células ocupam os espaços intersticiais do músculo e com as células satélites proporcionam a manutenção do tecido muscular. Adaptado de Sciorati et al. (2016).

Colágeno, o componente mais abundante da MEC, não apenas dá sustentação aos tecidos, mas também é responsável pela adesão e migração celular durante o crescimento, diferenciação e morfogênese. O colágeno do tipo I é o mais abundante no conteúdo intramuscular. Por outro lado, outros tipos tais como os colágenos II, VI, IX, XI-XVI e XVIII-XIX representam uma pequena parcela de colágeno na constituição total (KJÆR, 2004). Além disso, proteoglicanos como a decorina e a fibromodulina se ligam ao colágeno, desempenhando importante função na agregação do tropocolágeno, formando as fibrilas que irão compor a fibra de colágeno.

Considerando os proteoglicanos, o aumento na expressão dessas proteínas ocorre paralelamente ao aumento da expressão da miostatina (GDF-8, fator de crescimento que inibe o crescimento do tecido muscular) e fator de crescimento transformador- $\beta$  (Tgfb, proteína que controla a proliferação, diferenciação celular), sugerindo uma possível interação entre o desenvolvimento muscular e a MEC intramuscular. Simultaneamente ao desenvolvimento do músculo esquelético, pequenos proteoglicanos ricos em leucina da MEC intramuscular são expressos. Nesse contexto, estudos mostram que a decorina e a fibromodulina estão nitidamente elevadas durante alguns dias após o nascimento, assim como biglicanos e luminicanos encontram-se elevados uma semana pós-natal (KJÆR, 2004; KIERSZENBAUM; TRES, 2019).

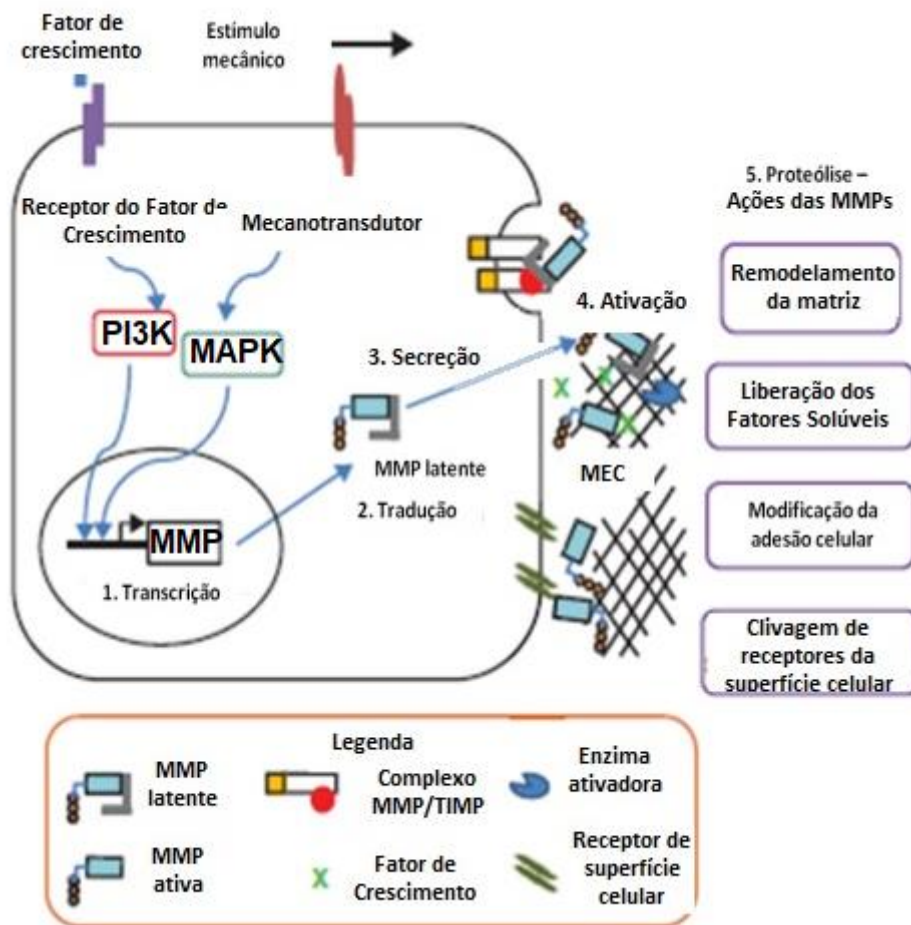
A decorina é um proteoglicano que possui função na fibrilogênese do colágeno, podendo interagir com os tipos I, II, III e IV, bem como VI, XII e XV. A partir dessas ligações, os processos teciduais são iniciados. Já a fibromodulina é um proteoglicano que interage junto com a decorina para modular a síntese de colágeno. É capaz de interagir com os colágenos tipos I e II. O glicosaminoglicano biglicano é identificado em ligação com a superfície das células musculares. Portanto, podem ligar-se à fibronectina, participando da morfogênese. O luminicano é um proteoglicano pequeno rico em leucina e está na MEC dos músculos esqueléticos. Promove a adesão e proliferação de mioblastos, porém inibe a diferenciação. Esses pequenos proteoglicanos são capazes de estimular fatores de crescimento como a miostatina, o TGF- $\beta$ , ou o IGF-1 (GARTNER; HIATTI, 1999; KIERSZENBAUM; TRES, 2019).

Em relação à degradação da MEC, a enzima metaloproteinase-2 de matriz (gelatinase A ou collagenase tipo IV; MMP-2), é uma metaloproteinases de matriz (MMP), principal classe de enzimas responsáveis pela degradação da MEC (KHOKHA; MURTHY; WEISS, 2013). As MMPs são endopeptidases cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) - dependentes, consideradas como fatores reguladores de diversas atividades que envolvem a manutenção da MEC e sua homeostase (KOSKINEN et al., 2001a). No caso do músculo esquelético, as MMP-2 apresentam um papel-chave na integridade da MEC intramuscular, embora haja evidência de que a mesma possa apresentar um papel na função e disfunção do músculo esquelético (CARMELI et al., 2004). Em condições fisiológicas, a MMP-2 é expressa nos fibroblastos, apresentando expressão aumentada em

condições patológicas em resposta a processos inflamatórios, como também no TF (CARMELI et al., 2004).

Geralmente são encontradas nos tecidos como pró-MMP, que representam o estágio latente da MMP, sendo sua expressão regulada através de fatores de crescimento e citocinas produzidas através do remodelamento tecidual, como observado na Figura 4 (KOSKINEN et al., 2001b; STERNLICHT; WERB, 2001). Uma das funções primordiais dessa enzima no estágio ativo é clivar o colágeno tipo IV, caracterizado como uma molécula helicoidal responsável por formar uma estrutura em rede que constitui a base da lâmina basal. Está presente no epimísio, no perimísio e endomísio, mas especialmente nas adjacências da membrana basal (Sanes, 2003) e apresenta uma função importante na organização do arranjo celular das fibras musculares esqueléticas (CARMELI et al., 2005). Nesse contexto, ao realizar o processo de clivagem, as MMPs participam do remodelamento da matriz e, conseqüentemente, de sua homeostase (VISSE; NAGASE, 2003).

As MMP-2 também degradam os proteoglicanos, fibronectina e laminina. Além disso, regulam a atividade de proteínas que participam do processo inflamatório e da fibrose (Niu et al., 2016; Tan; Liu, 2012), em processos tanto fisiológicos, quanto patológicos (XIAOPING; YONG, 2009a). A degradação da MEC também deve ser cuidadosamente controlada para que haja um remodelamento adequado. Para isso, o funcionamento das MMPs sofre regulação de inibidores específicos ou teciduais. As  $\alpha$ -macroglobulinas são inibidores gerais das MMPs e estão presentes nos fluídos dos tecidos e no sangue. Já os inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMPs) são proteínas pequenas multifuncionais (LLURI; JAWORSKI, 2009).



**Figura 4.** Representação esquemática das consequências relacionadas à produção e ativação das MMPs. A regulação da produção da MMP, além do processo de ativação pericelular são demonstrados. A ativação da MMP acarreta a proteólise dos componentes da MEC, liberação de fatores matriciais, modificação da adesão das células à matriz, e alterações no perfil dos receptores à superfície das células. Entretanto, a proteólise excessiva resulta em consequências patológicas e à progressão de diferentes doenças. Nota: PI3K – fosfoinosítídeo 3-quinase ou MAP Quinase; MMP – metaloproteinases de matriz; e MEC – matriz extracelular. Adaptado de Gorman et al. (2011).

Os TIMPs são responsáveis pela regulação das MMPs e as inibem através da sua interação com o sítio catalítico dessas enzimas (LAMBERT et al., 2004). Foram identificados quatro componentes dessa família de inibidores, havendo destaque para o TIMP-1, que é sintetizado por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos. Ademais, o TIMP-1 também é capaz de inibir todos os tipos de collagenases, estromelisinases e gelatinases ao realizar ligações com as formas ativas das MMPs, formando complexos não-covalentes (VISSE;

NAGASE, 2003). Já o TIMP-2 é responsável por inibir a MMP-2 e estabilizar a forma inativa da MMP, inibindo a formação da enzima ativa (CARMELI et al., 2004).

Evidências apontam que os TIMPs são proteínas multifuncionais envolvidas em diversas funções biológicas que podem ou não depender de sua função inibitória (CARMELI et al., 2004; CLARK et al., 2008). Também são ativadas com as MMPs em resposta ao exercício físico, indicando estímulo e inibição de clivagem concomitantes para limitar a degradação de colágeno (KJÆR, 2004). Além disso, esses inibidores são envolvidos na ativação das MMP-2 via formação do complexo TIMP-2/MMP-14/MMP-2. Isso protege a MEC da proteólise, aumenta a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (CLARK et al., 2008).

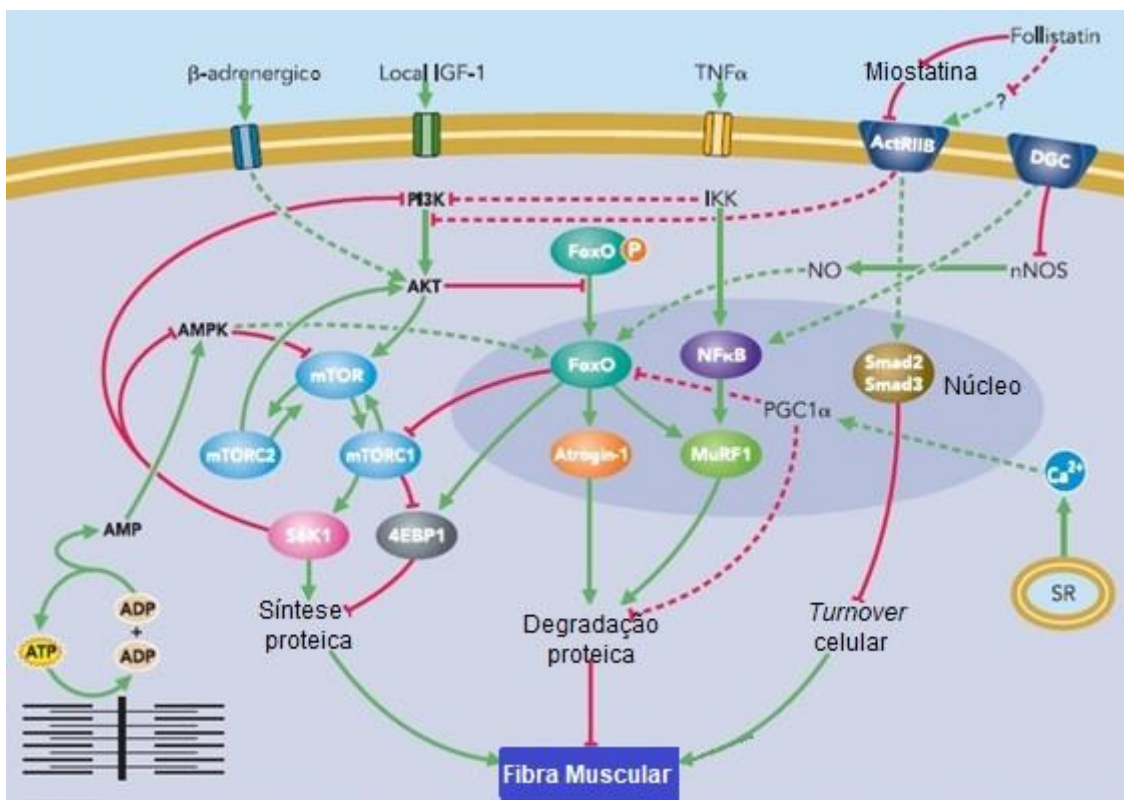
### **2.1.2 Fatores de Crescimento do Músculo Esquelético**

O gene TGF- $\beta$ 1 é o fator de crescimento transformador  $\beta$ 1, membro polipeptídico da superfamília beta de fator de crescimento transformador de citocinas. É envolvido na modulação da expressão dos componentes da MEC intramuscular. Apesar de possuir atividade fibrótica, também inibe a miogênese (DELANEY et al., 2017). Além disso, é conhecido como o mais potente fator profibrogênico e regulador do desenvolvimento fibrótico. Por outro lado, impacta negativamente na diferenciação dos mioblastos ao inibir a expressão de fatores regulatórios (MRF) da transcrição, sendo eles a miogenina e o MyoD. Ainda, a função do TGF- $\beta$ 1 também pode ser modificada por sua ligação a pequenos proteoglicanos, como a decorina e o biglicano (CENCETTI et al., 2013; LI et al., 2006).

Denominado Fator de Crescimento Insulino-dependente (IGF-1), é bem definido entre os fatores de crescimento e primordialmente responsável por regular as vias anabólicas e catabólicas do músculo esquelético e, conseqüentemente, o tamanho muscular. Essa característica o torna capaz de mediar diversos resultados benéficos decorrentes da prática do exercício físico (MAJORCZYK; SMOLAĞ, 2016; STEIN et al., 2018). Sob condições fisiológicas, o tamanho das fibras musculares resulta do equilíbrio entre síntese e degradação

de proteínas. Considerando o anabolismo, uma função de destaque do IGF-1 é a regulação da síntese proteica no músculo esquelético, sendo capaz de aumentar a proliferação e diferenciação dos mioblastos (CHAKRAVARTHY et al., 2000). No estágio proliferativo das células, o IGF-1 aumenta a expressão dos fatores de progressão do ciclo celular (ciclina, quinases dependentes de ciclina, fator de promoção e maturação, complexo promotor de anáfase/ciclossomo, pontos de checagem e reguladores), enquanto também promove a diferenciação por meio a expressão de fatores de transcrição que estimulam a diferenciação miogênica, como a miogenina (CHAKRAVARTHY et al., 2000). No caso da regeneração muscular esquelética, há a participação ativa das células satélites (Yoshida; Delafontaine, 2020), ao passo que a atrofia decorrente da desnervação no músculo de camundongos pode ser prevenida através da ativação do Akt (SACHECK et al., 2004).

Já em relação ao catabolismo, o fator de crescimento em questão diminui a autofagia (captação e degradação de porções do próprio citoplasma da célula através de lisossomos), que encontra-se aumentada nos fibroblastos de ratos com níveis baixos de IGF-1, *in vivo* (WANG; GU, 2018). Os dados presentes no estudo de Yoshida; Delafontaine (2020), mencionado anteriormente, sugerem que as vias IGF-1/Akt/mTOR e IGF-1/Akt/Foxo (Figura 5) inibem a autofagia, porém não há estudos que mensurem o processo dinâmico desse evento. Por isso, são necessárias mais pesquisas objetivando entender a função do IGF-1 na regulação da autofagia no músculo esquelético *in vivo* (WANG; GU, 2018). Além disso, os mecanismos relacionados à regulação da autofagia em doenças crônicas que induzem a perda de massa muscular não foram descritos ainda (YOSHIDA; DELAFONTAINE, 2020).



**Figura 5.** Esquema ilustrando as maiores vias responsáveis por controlar o tamanho da fibra muscular. As linhas pontilhadas representam as vias cujos mecanismos no músculo esquelético adulto ainda precisam ser completamente definidos. Adaptado de: Yoshida; Delafontaine, (2020).

### 2.1.3 Fatores de Transcrição da MEC e Reguladores Miogênicos

A transcrição representa o nível mais importante de regulação da expressão gênica, exercido durante o processo de transferência dessa informação dos genes para as moléculas de RNA mensageiro (BLACKWELL; WALKER, 2006). Através de estudos microscópicos, foi observado que a transcrição envolve a condensação de fatores no núcleo celular. Quando regulada, determina a identificação das células, assim como a função (CRAMER, 2019). Além disso, é realizada por uma maquinaria molecular composta por centenas de proteínas diferentes, que são montadas em etapas muito bem ordenadas (BLACKWELL; WALKER, 2006).

O Nfkb (Fator Nuclear Kappa Beta) é considerado um fator de transcrição que induz a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Tnfa, Il1b, Il6, Il8 e Il12) presentes no processo de atrofia do músculo esquelético (CARLSEN et al., 2009). Por ser um regulador primário das respostas inflamatórias e estímulos



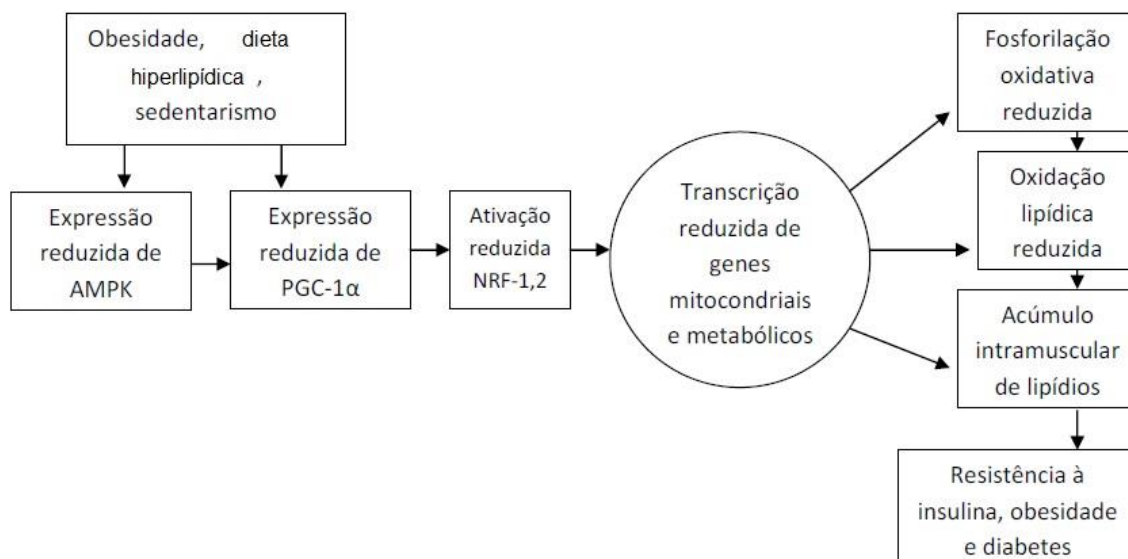
de estresse, pode estar ligado às doenças associadas ao aumento do tecido adiposo (CARLSEN et al., 2009). Sendo assim, na presença de estímulos estressantes ou patógenos, o Nfkb é ativado em várias células (BAUD; KARIN, 1978). Além disso, a modulação torna-se evidente em situações associadas a um sistema ubiquitina-proteassoma com regulação positiva e autofagia que pode ocasionar danos celulares e distúrbios musculares (ABRIGO et al., 2016; SANDRI et al., 2004).

Ainda considerando a atrofia da musculatura esquelética, outro fator de transcrição além do Nfkb também desempenha um papel importante nesse processo de atrofia muscular. O Foxo1 (Fator de Transcrição de Forquilha 1) e os membros da família de proteínas relacionadas são associados à promoção da apoptose em várias células através do aumento de receptores de morte celular e genes de sinalização pró-apoptótica (MCLOUGHLIN et al., 2009). É possível que o Foxo1 promova atrofia muscular e expressão de genes proteolíticos e/ou apoptóticos através de mecanismos diferentes da ligação direta ao promotor (MCLOUGHLIN et al., 2009). Ou seja, apesar da capacidade do Foxo1 de modular a expressão gênica através da ligação direta a elementos de resposta específica com os promotores do gene alvo, também é capaz de afetar a expressão gênica por meio de outros genes responsivos ao Foxo1, que podem sofrer alterações através de mecanismos que não requerem ligação direta ao DNA (SCHUUR et al., 2001).

Durante o crescimento, foi observada a expressão da proteína MyoD (Proteína 1 para Determinação de Mioblastos) – responsável por desempenhar uma relevante atribuição na regulação da diferenciação muscular -, antes do surgimento do Antígeno Nuclear da Célula em Proliferação (ANCP) nos núcleos dos mioblastos, que pode ser utilizado para indicar que as células satélites ingressaram no ciclo celular (ISHIDO; KAMI; MASUHARA, 2004). A proteína MyoD pertence à família das proteínas conhecidas como Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs), que são fatores de transcrição atuantes na diferenciação miogênica. É um dos marcadores que indicam o comprometimento miogênico, sendo expresso em níveis indetectáveis nas células satélites quiescentes, porém apresentando expressão ativada em resposta ao exercício ou dano muscular (KASSAR-DUCHOSSOY et al., 2004). No contexto de lesão, a expressão de MyoD é dose-dependente, sendo que a alta expressão compromete a renovação

celular, podendo induzir a apoptose. Funciona, portanto, como um fator determinante da proliferação ou diferenciação dos mioblastos (HINITIS et al., 2011; KASSAR-DUCHOSSOY et al., 2004).

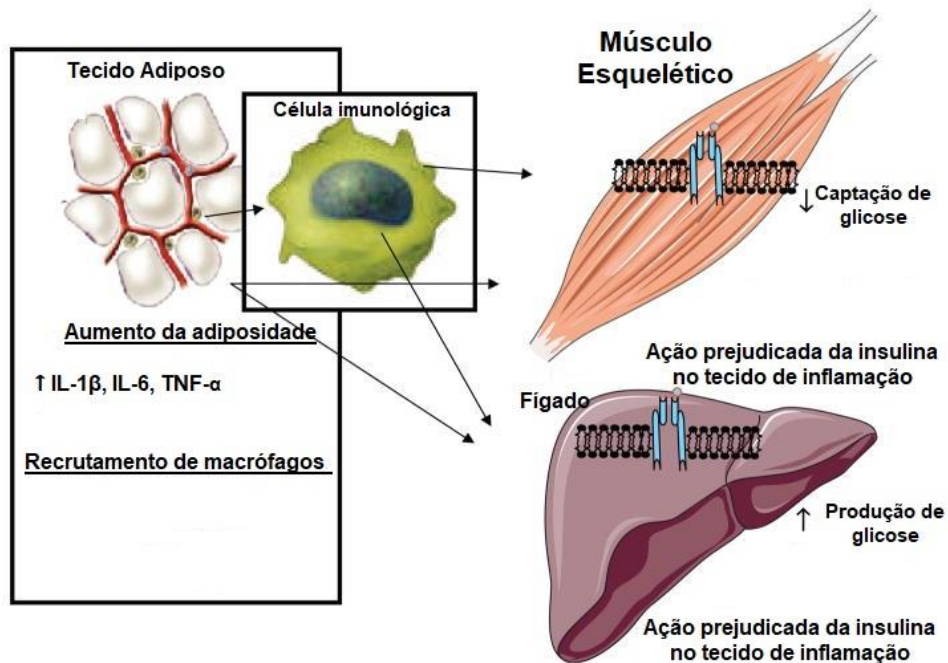
Já o Pgc1a é membro de uma família de co-fatores de transcrição responsáveis pela regulação do metabolismo celular, caracterizado como um importante regulador da biogênese mitocondrial nos tecidos adiposo e muscular esquelético (LIANG; WARD, 2006). Uma função de destaque é a capacidade de alterar o fenótipo muscular esquelético, tornando-o mais oxidativo (fibras musculares de contração lenta) e menos glicolítico (fibras musculares de contração rápida) (LIANG; WARD, 2006). Também está envolvido com diversas alterações metabólicas que são típicas do ganho excessivo de peso e obesidade (Figura 6) (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). Apresenta atividade mediada através do contato com os fatores de transcrição NR1 e 2, que são os Fatores Nucleares 1 e 2, como pela expressão do Fator de Transcrição Mitocondrial, o TFAM (SHORT et al., 2003). Quando o Pgc1a é expresso, promove o aumento da expressão de proteínas da cadeia respiratória e de enzimas implicadas na oxidação de ácidos graxos nos tecidos adiposo e muscular esquelético (TIRABY et al., 2003). A ativação de Pgc1a apresenta uma interação com a atividade da proteína Quinase Dependente da AMP (AMPK). Apesar de o mecanismo de interação entre AMPK e Pgc1a não estar totalmente elucidado até o presente momento, sabe-se que a AMPK fosforila Pgc1a e regula a transcrição de seu gene (JÄER et al., 2007).



**Figura 6.** Representação esquemática da diminuição da Proteína Quinase Dependente de AMP (AMPK), do Co-ativador-1 dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PGC-1 $\alpha$ ), e relação com o desenvolvimento do fenótipo metabólico presente nas condições de resistência à insulina e obesidade. Adaptado de Liang; Ward (2006).

#### 2.1.4 Miocinas

Curiosamente, o músculo esquelético possui a capacidade de expressar várias miocinas, incluindo a Il6 (Interleucina-6) (Lee; Jun, 2019), pertencente à família das interleucinas, expressa pelo gene Il6 nos mioblastos, miotubos e células satélites (KELLER et al., 2006; SERRANO et al., 2008). Também é expressa durante o exercício pelo fígado, sinalizando uma inflamação aguda, concomitantemente induzindo a expressão de outras interleucinas que apresentam efeito antiinflamatório crônico, tais como Il1ra (Antagonista do Receptor de Interleucina – 1) e Il10 (Interleucina – 10) (PEDERSEN; FISCHER, 2007). Essa importante miocina é produzida e lançada no período pós-exercício quando a ação da insulina está aumentada. Está associada à obesidade e à redução da ação da insulina (Figura 7), além de estar relacionada à perda de massa muscular esquelética em diferentes estágios de doenças crônicas (CAREY; FEBBRAIO, 2004; KELLER et al., 2006; SERRANO et al., 2008).



**Figura 7.** Representação esquemática de fatores secretados pelo tecido adiposo com atuação no músculo esquelético e no fígado resultando em resistência à insulina. Adaptado de: Roberts; Hevener; Barnard, (2013).

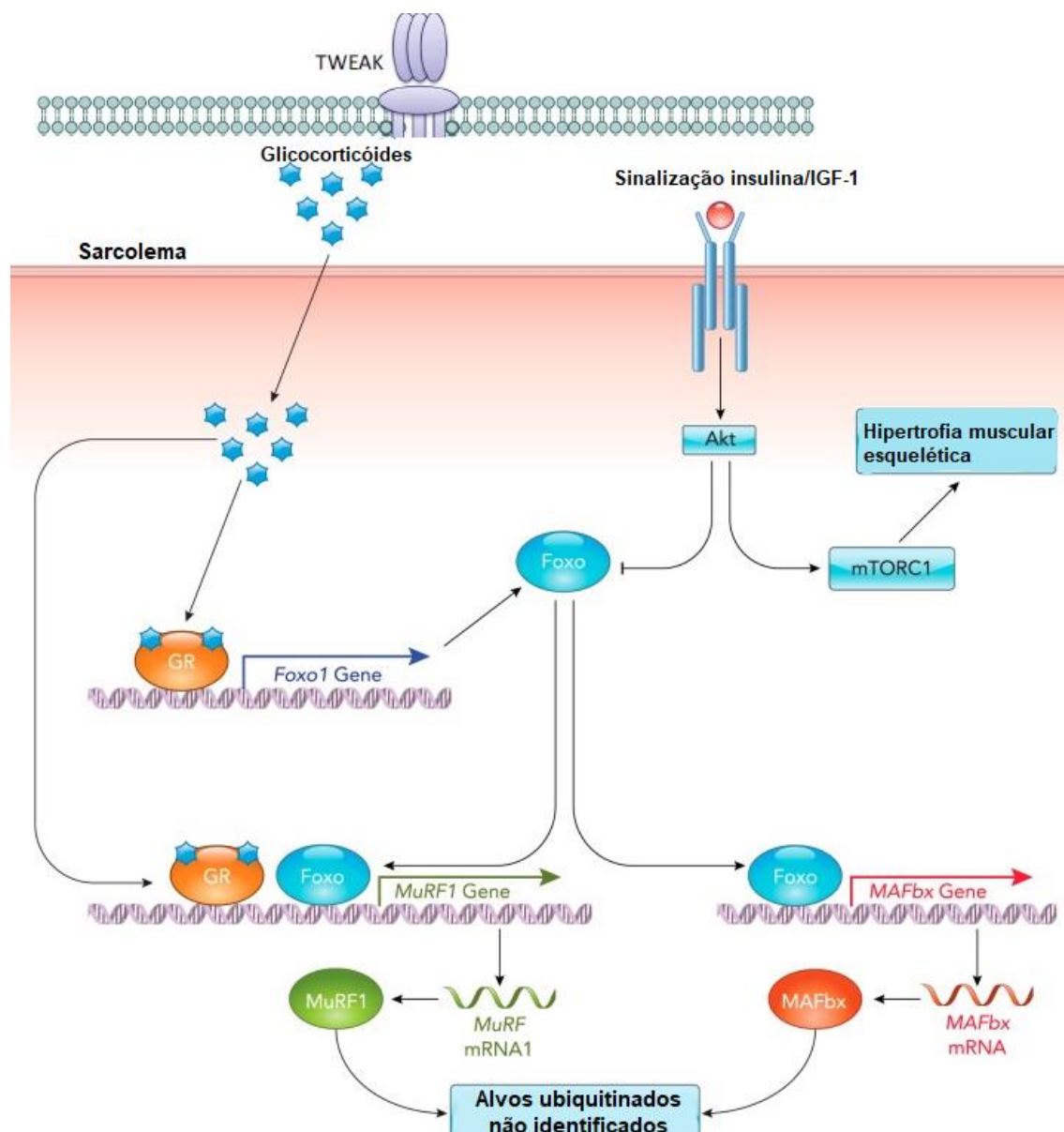
Apresenta efeito lipolítico (aumenta a oxidação dos ácidos graxos) na fibra muscular (Bruce; Dyck, 2004) ou no metabolismo (Wallenius et al., 2002) via AMPK (Kahn et al., 2005), e pró-inflamatório agudo (MUÑOZ-CÁNOVES et al., 2013; WALLENIUS et al., 2002). A Il6 foi a primeira miocina encontrada cuja secreção ocorre na corrente sanguínea em resposta às contrações musculares, sendo importante destacar que o aumento dos níveis dessa miocina na circulação ocorre sem que haja qualquer sinal de dano muscular (FISCHER; PHILIP, 2016). Além do mais, a resposta da Il6 é sensível à intensidade e duração do exercício, que representa indiretamente a massa muscular envolvida na atividade contrátil. A Il6 apresenta, também, um papel importante na miogênese durante a regeneração muscular (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008).

### 2.1.5 Proteínas e Vias Relacionadas à Atrofia Muscular

A atrofia muscular esquelética apresenta como particularidades o enfraquecimento, diminuição do tamanho e da massa muscular, bem como da área de secção transversal das fibras em nível histológico. É evidenciada por

diminuição na produção de força, alta fatigabilidade e diminuição no desempenho do exercício físico, acarretando menor qualidade de vida. Considerando os mecanismos relacionados, há vários processos envolvidos na atrofia, incluindo o estresse oxidativo e inflamação, responsáveis por ativar a transdução de sinal como o mTOR, sistema lisossomal de autofagia e sistema de ubiquitina-proteassoma (YIN et al., 2021).

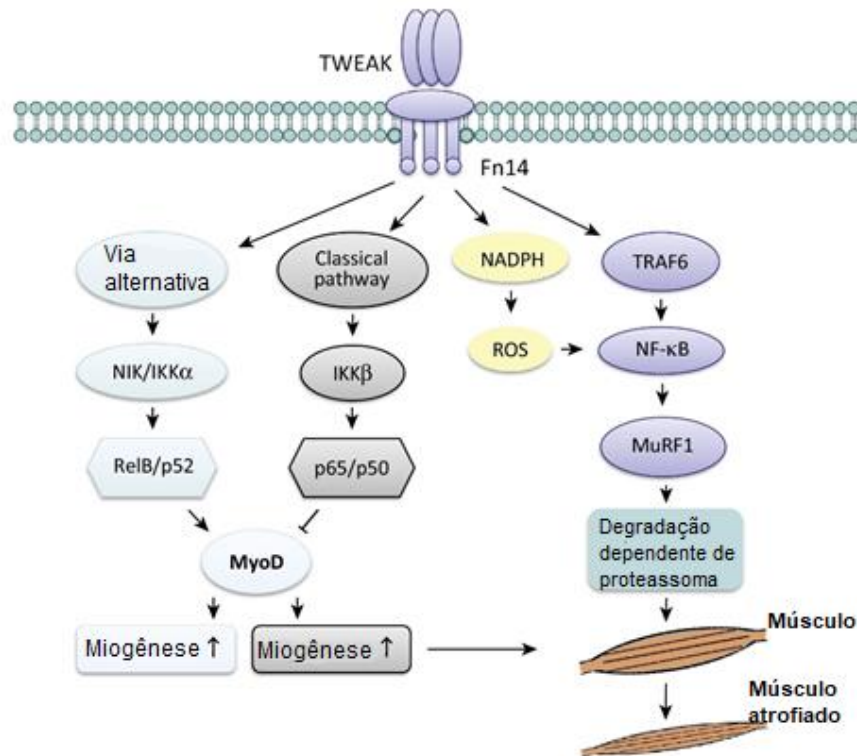
A Murf1 (ubiquitina proteína ligase E3 - 1) é uma proteína específica do músculo esquelético que se liga ao domínio quinase da proteína sarcomérica titina (Lipina et al., 2010), desempenhando importante função no remodelamento muscular (HERAS et al., 2019). Representa uma das diversas ubiquitina-ligases E3 expressas no músculo esquelético. Está localizado dentro da fibra muscular (Figura 8), na linha M do sarcômero. Adicionalmente, foi encontrado nas linhas Z (Lipina et al., 2010; Oliver et al., 2005) e no núcleo (KOLEVA et al., 2005; LIU et al., 2012; OLIVER et al., 2005). Essa proteína é capaz de realizar a degradação mediada pelo sistema ubiquitina proteassoma de proteínas musculares sarcoméricas, tais como a troponina I e a miosina de cadeia pesada (GLASS; ROUBENOFF, 2010). Curiosamente, a regulação positiva da transcrição do gene Murf1, em resposta a fatores estressores, resulta em atrofia muscular. Em destaque, mutações pontuais do gene Murf1 acarretam distúrbios musculares caracterizados pelo acúmulo de proteínas nas fibras musculares (HERAS et al., 2019). Além do mais, a supressão ou inibição completa da expressão do gene em questão resulta em perda de massa muscular em vários modelos de atrofia induzida, caracterizando-o como um *atrogene* (BODINE; BAEHR, 2014).



**Figura 8.** Ilustração representativa de uma via bem estabelecida para a trofia muscular esquelética, envolvendo MuRF1 e MAFbx (Atrogin-1). Observa-se o aumento da expressão dos genes E3 ubiquitina ligase, MuRF1 E MAFbx nas condições de privação de nutrientes, carga externa ou atividade neural, além da exposição do músculo esquelético ao excesso de glicocorticóides ou idade avançada. O aumento da transcrição de MuRF1 ou MAFbx é parcialmente controlado pela ativação de fatores de transcrição Foxo e do receptor de glicocorticoides (GR). O aumento da expressão de MuRF1 e MAFbx acarreta atrofia muscular através de mecanismos bioquímicos que ainda não estão totalmente elucidados. No músculo esquelético de um jovem adulto saudável, a sinalização de insulina IGF-1/Akt e um baixo nível de glicocorticoides inibem a atividade dos fatores de transcrição Foxo. Além disso, a sinalização de insulina/IGF-1 apresenta dupla função, podendo inibir a atrofia, assim como estimular a síntese proteica e a hipertrofia via Akt e mTORC1. Adaptado de Ebert et al.(2019).

Um dos ativadores do Nfkb mais caracterizados é o Tnfa (Rommel et al., 2001), produzido por monócitos, macrófagos, células NK (*natural killers*), células endoteliais, células musculares lisas (Koleva et al., 2005), em adipócitos e no músculo esquelético (ROMMEL et al., 2001). Caracteriza-se como uma molécula solúvel ao soro e suprime relevantemente o crescimento tumoral em camundongos (LOKIREDDY et al., 2012). Além disso, por induzir intensa atrofia muscular em camundongos, é considerado como o hormônio caquectina (CLARKE et al., 2007). Quando o músculo é exposto ao Tnfa, conseqüentemente há perda de proteína muscular total, sendo esse processo regulado pelo Nfkb (CLARKE et al., 2007). Assim, há nítida associação entre a ativação do Tnfa, Nfkb e atrofia muscular.

Também é importante destacar que o Nfkb é ativado no músculo esquelético em resposta a diversos estímulos catabólicos, incluindo a proteína multifuncional membro da superfamília TNF de citocinas, o Tweak (BURKLY; MICHAELSON; ZHENG, 2011; WINKLES, 2008). O Indutor Fraco de Apoptose Relacionado ao TNF, o Tweak, é um importante regulador de massa e função do músculo esquelético (SATO et al., 2015). Também conhecido como Membro 12 da Superfamília do Ligante do Fator de Necrose Tumoral, encontra-se totalmente funcional nas formas ligadas à membrana (Figura 9) e nas formas solúveis (WINKLES, 2008). Tendo em vista que as células miogênicas respondem ao TWEAK, um dos mecanismos mais importantes pelo qual induz a atrofia muscular é aumentando a expressão de Murf1 e ativando o sistema ubiquitina-proteassoma. Em diversas condições de atrofia muscular esquelética, a expressão de Murf1 e Atrogin-1 – ligases de ubiquitina E3 – encontra-se aumentada (GLASS, 2010; SANDRI, 2008). Ademais, os estudos de Christ-Roberts et al. (2004); Nieto-Vazquez et al. (2008) identificaram que o TWEAK pode reduzir os níveis de MyoD, além de ativar as vias de sinalização NF e MAPK (Proteína-quinases Ativadas por Mitógenos) (SATO et al., 2015).



**Figura 9.** Representação esquemática da sinalização TWEAK/FN14 na miogênese e atrofia muscular. A miogênese pode ser inibida ou estimulada com base na concentração de TWEAK. Quando encontrado em baixas concentrações, TWEAK ativa a via alternativa (NIK/IKK/), promovendo a fusão de mioblastos. Em altas concentrações, TWEAK ativa a via clássica (IKKb) para inibir a diferenciação. Além disso, a sinalização TWEAK/Fn14 também pode promover a degradação de proteínas através da ativação de NF- $\kappa$ B via TRAF6 ou NADPH. Adaptado de Zhou et al. (2016).

### 2.1.6 Proteínas e Vias Relacionadas a Hipertrofia Muscular

O equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas é um método eficiente para reparo muscular, prevenindo a apoptose e mantendo a massa muscular esquelética. A hipertrofia ocorre quando a síntese é superior à quebra de proteínas (HILL; GOLDSPINK, 2003; TOIGO; BOUTELLIER, 2006). É um processo mediado pela ativação das células satélites, presentes entre a lâmina basal e o sarcolema (HAWKE; GARRY, 2005; YONG, 1994). Quando um estímulo mecânico atinge o músculo esquelético e ativa as células satélites, há a proliferação, diferenciação e posterior fusão nas células musculares existentes lesionadas ou entre si para criar novas fibras musculares, fornecendo as condições adequadas para reparo e consequente crescimento de tecido



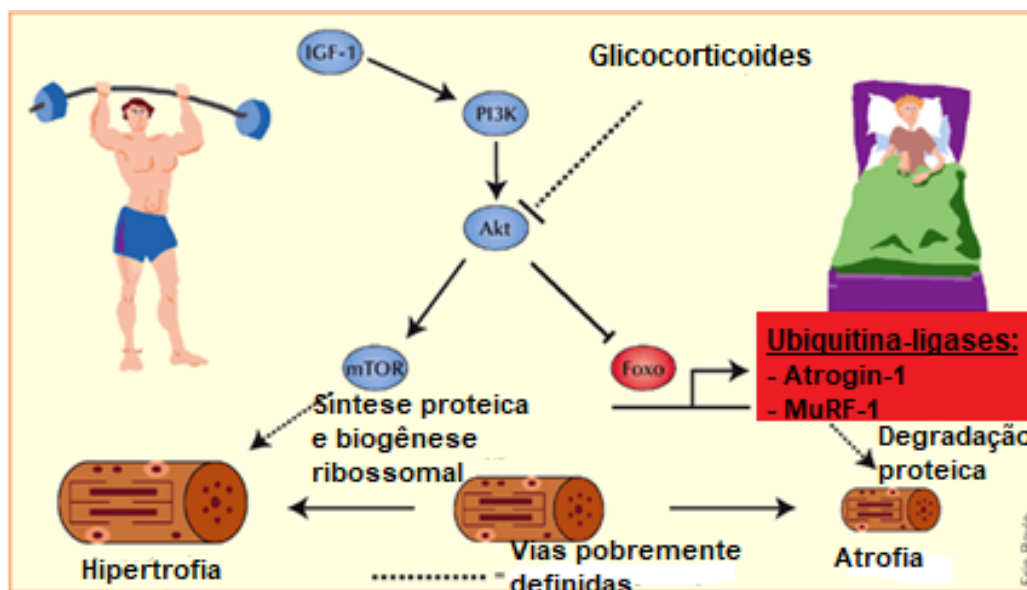
muscular (TOIGO; BOUTELLIER, 2006;).

As células satélites podem colaborar com a hipertrofia muscular de diferentes formas: 1) doando núcleos extras para as fibras musculares, proporcionando maior capacidade de sintetizar proteínas contráteis (MOSS; LEBLOND, 1971); 2) retendo a capacidade mitótica, formando um *pool* de núcleos musculares para dar suporte ao crescimento muscular; 3) regulando a produção de RNAm para um volume sarcoplasmático finito, sendo que qualquer aumento na fibra muscular deve ocorrer com um aumento proporcional nos núcleos musculares. Considerando que os músculos esqueléticos são compostos por várias regiões repletas de núcleos, a hipertrofia muscular pode resultar de um aumento no número de regiões através do aumento do número de núcleos, ou aumento do tamanho de regiões existentes. Ambos parecem ocorrer na hipertrofia com grande parcela de contribuição das células satélites (TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Ademais, as células satélites expressam fatores reguladores miogênicos, tais como Myf5, MyoD, miogenina e MRF4, responsáveis por auxiliar no reparo, regeneração e crescimento muscular (CORNELISON; WOLD, 1997).

Além disso, há várias vias de sinalização que facilitam os estímulos mecânicos promoverem respostas moleculares que alteram o equilíbrio proteico muscular, favorecendo a síntese ao invés da degradação (Figuras 10 e 11). Nesse contexto, a via Akt/mTOR é crucial para o crescimento do músculo esquelético (Bodine et al., 2001; Jacinto; Hall, 2003), já que Akt é um efetor da sinalização anabólica e um inibidor dominante de sinais catabólicos, como ilustrado nas Figura 10 (HOPPELER, 2016; TOIGO; BOUTELLIER, 2006). Quando ativado, o Akt sinaliza mTOR, que exerce efeitos em vários alvos responsáveis pela promoção da hipertrofia muscular esquelética. A AMPK é outro regulador imprescindível da expressão gênica, *status redox* (relação oxidação-redução, fator significativo para a manutenção e defesa das células) e metabolismo (Kramer; Goodyear, 2007), sendo específica para a hipertrofia do músculo esquelético induzida pelo exercício, modulando o crescimento e diferenciação dos miócitos (ROUX; BLENIS, 2004). Da mesma forma, várias vias dependentes de  $Ca^{2+}$  participam da regulação da hipertrofia muscular. Nesse caso, a calcineurina é um regulador crítico na cascata de sinalização de  $Ca^{2+}$ , mediando efeitos hipertróficos (SAKUMA; YAMAGUCHI, 2010). A sinalização

dependente de calcineurina está relacionada a hipertrofia de todos os tipos de fibras e, quando ausente, previne o crescimento muscular, mesmo na presença de sobrecarga no músculo (DUNN; BURNS; MICHEL, 1999; DUNN; CHIN; MICHEL, 2000).

Muitos hormônios e citocinas contribuem para a resposta hipertrófica, como Il5 e Il6, que promovem o anabolismo. A insulina também participa das atividades anabólicas, atenuando a proteólise ao invés de aumentar a síntese proteica. O Igf1 é considerado o principal hormônio anabólico e parece fornecer a principal resposta mediante a carga mecânica (HAMEED et al., 2004). Durante o TF, os músculos produzem mais Igf1 sistêmico do que o fígado, assim como usam mais Igf1 circulante (GOLDSPINK, 2005). Apesar dos mecanismos exatos de ação não serem totalmente elucidados, acredita-se que a mecanoestimulação desencadeie o início da hipertrofia muscular. Os níveis permanecem elevados durante algum tempo após o término do TF, apresentando efeitos miogênicos até 72h depois (MICHELS; HOPPE, 2008). Apesar dos mecanismos exatos de ação do Igf1 não serem totalmente elucidados, acredita-se que a mecanoestimulação induza o início da hipertrofia muscular esquelética.



**Figura 10.** As proteínas Akt1 e FOXO momentos antes de induzirem hipertrofia versus atrofia muscular. Akt1 parece ser a força de equilíbrio entre atrofia e hipertrofia. Resumidamente, o IGF-1 e outros estímulos anabólicos ativam a via PI3K-Akt1, levando à ativação de alvos (mTOR e S6K1) que estimulam a síntese de proteínas musculares, ocasionando a hipertrofia. Akt1 também é responsável pelo estado de fosforilação da família FOXO de fatores de transcrição. Quando FOXO é fosforilado por Akt1, deixa o núcleo e se torna inativo, inibindo a indução de atrofia. Se a atividade de Akt1 é suprimida, FOXO torna-se desfosforilado e transcricionalmente ativo, ligando-se diretamente ao gene de ubiquitinação de Atrogin-1, aumentando a degradação proteica e atrofia muscular. Adaptado de Baldwin et al. (2013).

### 2.1.7 Reguladores e Vias de Insulina no Músculo Esquelético

Há evidências da serina/treonina quinase Akt (proteína quinase B) agindo como o regulador central da insulina (WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002). Em mamíferos, Akt existe em três isoformas subdivididas em Akt 1-3, codificadas por três genes diferentes. A isoforma Akt 1 é expressa em todos os tecidos, a Akt 2 é expressa em tecidos metabólicos tais como o músculo esquelético (compõe aproximadamente 90% da família), tecido adiposo e fígado; e a Akt 3, no cérebro e testículos (PENG et al., 2003). Quando inibida, a sinalização da insulina no músculo esquelético via Akt resulta em disfunção metabólica. A Akt apresenta efeito tempo-dependente na sensibilidade à insulina muscular, de tal maneira que a inibição aguda da sinalização da Akt é necessária para a sensibilidade à insulina. Quando ativada, a Akt ocasiona a redistribuição da isoforma GLUT-4 do transportador de glicose sensível à insulina presente nas vesículas de armazenamento intracelular, para a membrana plasmática (JAISWAL et al., 2019). Além disso, uma redução crônica da atividade da Akt em músculo esquelético resulta na ativação de via canônica para a captação de glicose (JAISWAL et al., 2019) .

Na presença de resistência à insulina, também deve haver, concomitantemente, a diminuição da expressão gênica de atrogenes como Murf1 e Atrogin-1, além da inibição da degradação de proteínas através da insulina e Igf1. No caso de haver aumento do Igf1 ou do Akt, ocorre a inibição da expressão de Atrogin-1 e Foxo (SANDRI et al., 2004). Além disso, a via IGF/PI3K/Akt suprime a expressão de Atrogin-1 através da inativação de fatores FOXO (*forkhead*), já que esses fatores podem causar atrofia dos miotubos e das fibras musculares maduras. Nesse contexto, a inibição dos fatores Foxo é uma abordagem para combater a perda de massa muscular esquelética (SANDRI et al., 2004). Curiosamente, a proteína mais induzida durante a atrofia muscular é a Atrogin-1 (Atrogina-1), e a expressão rápida dessa proteína é necessária para ocorrer uma rápida atrofia muscular (NADER; MCLOUGHLIN; ESSER, 2005). Essa indução parece ocorrer independentemente de mTOR (Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos)/S6K, já que o Igf1 é capaz de suprimir a expressão de Atrogin-1, mesmo nos casos onde há inibição quase completa de mTOR/S6K – via responsável pela iniciação da tradução e síntese de proteínas, que aumenta

a tradução de RNAm específico e resulta no alargamento da fibra muscular (NADER; MCLOUGHLIN; ESSER, 2005; SANDRI et al., 2004; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006).

O mTOR é um regulador do tamanho muscular, cuja função está na resposta de remodelamento do músculo esquelético secundária ao exercício físico (HORNBERGER et al., 2003; IDE; LAZARIM; MACEDO, 2011; PALLAFACCHINA et al., 2002; REYNOLDS IV; BODINE; LAWRENCE, 2002). Nesse contexto, o exercício físico é capaz de estimular os mediadores anabólicos do músculo esquelético por meio da via mTOR (PI3K/Akt/mTOR/P70S6K). Quando essa via é ativada através da sinalização de PI3K em condições de exercício físico, culmina na ativação do efector P70S6K (IDE; LAZARIM; MACEDO, 2011). Também representa uma via de sinalização-chave no processo de diferenciação e controle do tamanho celular (SCHMELZLE; HALL, 2000). Segundo registros na literatura (Nader; MCLoughlin; Esser, 2005; Wullschleger; Loewith; Hall, 2006), a via mTOR controla mecanismos relacionados à síntese proteica em diferentes níveis, incluindo a eficiência e a capacidade da tradução.

Sabe-se que a ativação da sinalização mTOR leva ao aumento da síntese proteica, sendo um dos caminhos a ativação de P70S6K, proteína ribossômica S6 quinase beta-1, caracterizada como uma serina treonina quinase. No entanto, a ativação de mTOR parece nem sempre ser capaz de ativar P70S6K. Estudos também mostram a ativação de mTOR/P70S6K mesmo na ausência da ativação de Akt (MASCHER et al., 2008). Além disso, em ratos deficientes de miostatina, a expressão total de Akt foi aumentada simultaneamente ao aumento de P70S6K (LIPINA et al., 2010; TRENDELENBURG et al., 2009).

Surpreendentemente, a visão clássica da MEC era a de uma estrutura totalmente passiva. Porém, atualmente compreende-se mecanismos cujas funções permitem a homeostase de seus componentes e promove a capacidade de adaptação da fibra muscular e do músculo esquelético diante das mudanças no ambiente externo ocorridas em situações, tais como a sobrecarga mecânica causada pelo TF e a exposição à dieta hiperlipídica, alvos do presente estudo.

## **2.2 Dieta hiperlipídica e seus efeitos deletérios na MEC muscular esquelética**

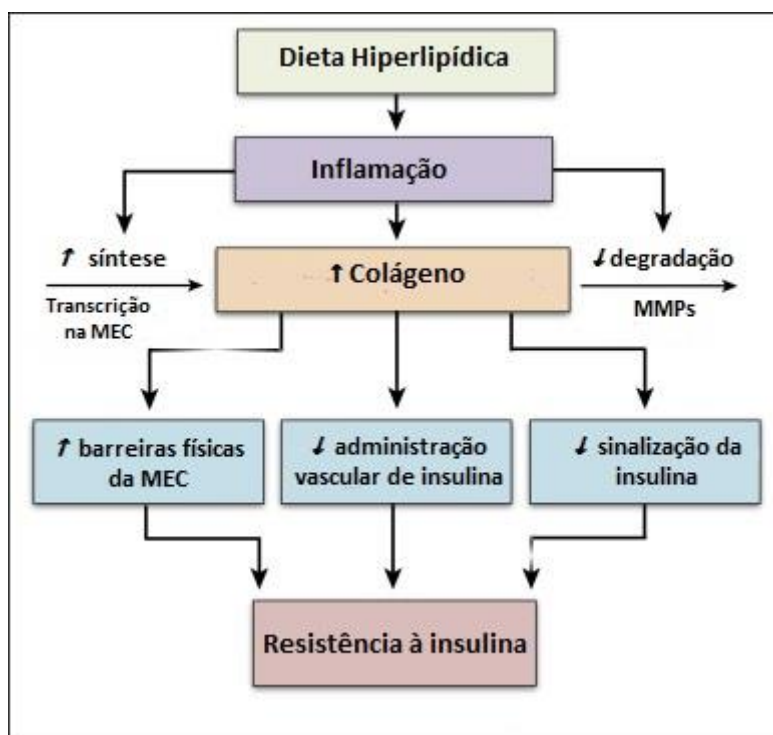
Há evidências de que as mudanças no estilo de vida populacional tem impactado drasticamente nos hábitos alimentares contemporâneos, culminando na “desestruturação das refeições”. Os alimentos enlatados e industrializados modificaram o cenário alimentar especialmente por sua praticidade no preparo, impactando diretamente na saúde da população em virtude dos seus altos índices de gordura (YAN; BASTIAN; GRIFFIN, 2015).

A concentração de gorduras saturadas e insaturadas da dieta é capaz de influenciar no perfil lipídico e metabólico, peso corporal e, conseqüentemente, a adiposidade (PELLIZZON et al., 2002). De acordo com Feoli et al. (2003) e Boden-Abdala et al. (2015), altos teores lipídicos na alimentação induzem o aumento do peso corporal em animais experimentais e humanos. Isso se deve ao fato de a gordura poder influenciar nas funções metabólicas, contribuindo para modificações na composição corporal. Ainda segundo Feoli et al. (2003), animais treinados aerobicamente que foram alimentados com dietas de baixo teor lipídico reduziram a gordura corporal consideravelmente, quando comparados aos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Isso demonstra o papel crucial do exercício físico na proteção contra efeitos deletérios provenientes de dietas não saudáveis e que propiciam o surgimento de um perfil inflamatório.

A vida de sinalização Nfkb representa um fator de transcrição de destaque que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias variadas, envolvidas no processo atrofico do músculo esquelético, como o Tnfa, Il1b, Il6, Il8, Il12. Ademais, o aumento da expressão do Nfkb é evidenciado em condições de catabolismo associadas ao aumento do sistema ubiquitina-proteassoma e autofagia, podendo resultar em danos celulares e distúrbios musculares (ABRIGO et al., 2016; SANDRI, 2008).

A dieta hiperlipídica favorece o aumento no tecido adiposo, que por sua vez pode prejudicar o remodelamento do músculo esquelético devido à forte associação entre adipócitos e macrófagos, predispondo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Il1 e Il6) e o Tnfa na circulação sanguínea com o aumento do tecido adiposo (CARMELI et al., 2004; CESARI et al., 2005). Essas citocinas estimulam a expressão dos genes que sintetizam colágeno intramuscular, como

COL1A1 e COL3A1. Concomitantemente, o perfil inflamatório diminui a expressão gênica da MMP-2 e altera a homeostase com os TIMPs. Com isso, há um desequilíbrio entre síntese e degradação de colágeno, resultando em um perfil intramuscular pró-fibrótico, provocando alterações morfológicas, que podem acarretar alterações funcionais no músculo esquelético, como podemos observar na Figura 11 (COLETTA; MANDARINO, 2011; KJÆR, 2004).



**Figura 11.** . Esquema representativo apresentando as vias relacionadas à resistência à insulina ocasionada pelo consumo de dieta hiperlipídica . Adaptado de: Wasserman (2019).

O perfil inflamatório decorrente do exercício físico também aumenta a atividade das células satélites, responsáveis pelo ganho de massa muscular (CARMELI et al., 2004). A literatura sobre regeneração muscular indica que essas células são responsáveis pela reparação e substituição das fibras musculares danificadas (ADAMS, 2006; CARMELI et al., 2004).

Brown et al. (2015) foram os primeiros a investigar a via de sinalização Akt em uma condição que apresentou resposta comprometida durante o início da regeneração muscular esquelética. Esse estudo envolveu 48 camundongos com três semanas de vida, randomizados nos grupos dieta controle e dieta

hiperlipídica, submetidos a 12 semanas de consumo. Os autores observaram a resposta inflamatória prejudicada em camundongos obesos no nível de indução de Tnfa. Além disso, a expressão de Il6 estava diminuída no músculo dos animais, sendo essa interleucina responsável pelo recrutamento e infiltração de fagócitos para o local da lesão durante a regeneração do músculo esquelético, além de ser importante para a fusão de mioblastos após a ativação das células satélites. Aparentemente, o recrutamento e infiltrado de macrófagos podem estar desregulados, justificando a razão pela qual a Il6 é descrita como elevada sistemicamente e a indução encontra-se diminuída no músculo esquelético. Os estudos de Zhang et al. (2013) e Nguyen; Cheng; Koh, (2011) corroboram esses registros, observando, respectivamente, a diminuição no recrutamento de macrófagos em camundongos obesos nocaute para Il6, e diminuição de macrófagos no músculo de camundongos obesos durante a regeneração. Aparentemente, a sinalização de Il6 encontra-se alterada em ratos obesos. Ademais, Brown et al. também observaram que a expressão de Igf1 diminuiu nos camundongos obesos em comparação com os magros. Deve haver uma regulação positiva do Igf1 e seus alvos, levando ao aumento da síntese de proteínas. Esse aumento é necessário para facilitar o crescimento muscular. Ainda, a expressão dos níveis basais de MyoD foi significativamente menor em camundongos obesos. É importante ressaltar que essa expressão é essencial na regeneração para haver a proliferação de mioblastos. A fosforilação de P70S6K também estava diminuída em camundongos obesos que apresentavam lesão muscular esquelética. Essa diminuição é sugestiva de respostas que envolvem a síntese de proteínas estar comprometida em camundongos obesos após lesão muscular (BROWN et al., 2015).

No estudo de Castorena (2016), os ratos foram divididos em grupos alimentados com dieta controle ou com dieta hiperlipídica durante duas semanas. Após a eutanásia, os músculos epitrocleares, localizados acima do epicôndilo medial do úmero (pronador redondo, flexor radial do carpo, palmar longo, flexor ulnar do carpo, flexor superficial dos dedos), foram selecionados para análise. Os pesquisadores notaram que a dieta hiperlipídica de curto prazo empregada reduziu a captação de glicose estimulada pela insulina nos músculos epitrocleares isolados, caracterizando mais um impacto negativo da dieta hiperlipídica na musculatura esquelética.



Além dos registros anteriormente mencionados, no estudo de Ropelle et al. (2006), cujos animais foram divididos em três grupos (ratos alimentados com dieta controle, ratos obesos alimentados com dieta obesogênica durante 3 meses, e ratos obesos alimentados com dieta obesogênica submetidos ao exercício físico), e três meses consumindo dieta hiperlipídica resultaram na diminuição dos níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  (membro de uma família de proteínas celulares que funcionam para inibir o fator de transcrição Nfkb) em ratos, indicando a ativação da via IKK/Nfkb, uma das responsáveis pela atrofia muscular esquelética.

Além disso, estão os achados de Bacquer et al., (2007) – ratos com 8 semanas de vida divididos em dois grupos: um para consumo de dieta controle e outro, para dieta hiperlipídica, durante 16 semanas – e Rivas et al., (2018) – ratos com 4 semanas de vida divididos nos grupos mediante a dieta a ser consumida: dieta controle, com 8 ratos no grupo; dieta hiperlipídica, com 16 animais no grupo, durante 4 semanas de consumo alimentar. Ambos demonstraram que a dieta hiperlipídica entre 8 e 16 semanas promove o aumento da fosforilação de mTOR, P70S6K e/ou RPS6 (proteína ribossômica S6) no músculo esquelético de ratos.

Nesse contexto, Sitnick; Bodine; Rutledge (2009) demonstraram pela primeira vez que a exposição crônica de camundongos jovens a uma dieta hiperlipídica durante 14 semanas resultou em uma atenuação do crescimento muscular esquelético em resposta a um aumento de carga imposta ao tecido muscular esquelético, presente no TF. Nesse estudo, o músculo plantar (predominantemente glicolítico) dos camundongos apresentou uma resposta de crescimento significativamente impactada mediante a sobrecarga funcional. Ainda, camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por um período mais longo (30 semanas), e depois submetidos ao TF, apresentaram uma falha completa de crescimento em resposta ao estímulo. A resposta de crescimento atenuado nos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica foi associada a uma diminuição na ativação de Akt e seu alvo S6K1. Os dados apresentados sugerem que o consumo crônico da dieta hiperlipídica interfere na sinalização celular envolvida na resposta muscular ao aumento da carga, resultando na diminuição da ativação das vias de síntese proteica. No entanto, os mecanismos responsáveis pela resposta celular alterada mediante o estímulo de sobrecarga presente no

TF ainda são desconhecidos. A diminuição da sinalização de Akt/mTOR sugeriu que os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram falha na ativação adequada da iniciação de tradução proteica, diminuindo a síntese de proteínas e o crescimento muscular que são consequências do TF (SITNICK; BODINE; RUTLEDGE, 2009).

Considerando o remodelamento, a despeito de estar bem fundamentado na literatura que as MMPs participam tanto do remodelamento do tecido muscular esquelético quanto do desenvolvimento de processos patológicos (Marqueti et al., 2008), os mecanismos pelos quais o remodelamento acontece em ratos submetidos à dieta hiperlipídica não estão completamente elucidados no músculo esquelético (STAMENKOVIC, 2003; YAMADA et al., 2006).

Nos casos de diminuição da atividade de MMP-2, a liberação de fatores de crescimento locais, tais como Tgfb1, Ctgf e Igf1, também pode ser comprometida, além do comprometimento na proliferação, diferenciação e migração das células satélites (MARTINEZ-HUENCHULLAN et al., 2017). Apesar dos registros na literatura demonstrarem que a dieta hiperlipídica impacta de forma desfavorável no remodelamento da MEC muscular, ainda não foram totalmente elucidados os mecanismos envolvidos no trofismo, inflamação e adipogênese. Sendo assim, mais estudos são necessários para delimitar os efeitos deletérios causados pela dieta hiperlipídica no músculo esquelético.

Kang et al. (2014) mostraram que a atividade muscular da MMP-9, gelatinase responsável por degradar colágeno tipo I e outros componentes da MEC, estava diminuída em fêmeas submetidas à dieta hiperlipídica, mas não em machos da mesma espécie alimentados com a mesma dieta. Também encontraram que, na presença da dieta hiperlipídica, a deleção da MMP-9 preveniu a obesidade induzida pela dieta em fêmeas, mas não em machos. Esses achados sugerem que a MMP-9 pode interagir com hormônios sexuais, como o estrogênio, na regulação da adiposidade, exibindo respostas sexuais dimórficas na presença de dieta hiperlipídica. Essa redução na atividade enzimática é inversamente relacionada ao depósito muscular de colágeno e diretamente à resistência muscular à insulina. Nesse contexto, esses achados destacam a importância de se considerar que os efeitos metabólicos ocasionados pela dieta hiperlipídica não são iguais em ambos os sexos, sofrendo variação dos hormônios sexuais femininos.

Em relação ao colágeno presente na MEC do tecido muscular, Tam et al. (2015) curiosamente demonstraram que os níveis de COL1, 3 e 6 estavam mais baixos após 5 semanas de dieta hiperlipídica. Sugere-se que o desequilíbrio na expressão dos genes relacionados ao remodelamento da MEC, proporcionado pela dieta hiperlipídica, aumente a expressão de MMP-2 e a degradação de colágeno. Além disso, habilidades motoras físicas encontraram-se alteradas em ratos submetidos à dieta com alto teor de gordura. A redução das habilidades motoras foi associada a maior expressão dos genes que produzem COL3 e COL6 no músculo gastrocnêmio após consumo desse tipo de dieta a curto prazo, sugerindo que a expressão aumentada de colágeno na matriz extracelular no músculo pode estar ligada ao declínio da função física.

Pincu et al. (2015), em um estudo envolvendo ratos submetidos a 12 semanas de exposição à dieta hiperlipídica e exercício aeróbio moderado (corrida voluntária na roda, 10 a 20 minutos, 10-12 m/min), mostraram um aumento significativo na expressão dos genes *Tgfb1* e *COL1A1* nos músculos gastrocnêmio e sóleo dos ratos submetidos à dieta hiperlipídica, sendo que essa resposta foi amenizada pelo exercício físico. O fato da dieta associada ao exercício alterar as variáveis relacionadas à síntese de colágeno sugere que o exercício pode diminuir a fibrose muscular esquelética decorrente da dieta hiperlipídica.

Corroborando os estudos supracitados em relação aos impactos negativos no tecido muscular esquelético frente a uma dieta hiperlipídica, também foi mostrada uma expressão gênica aumentada de marcadores inflamatórios no músculo esquelético, como o F4/80, um marcador de macrófagos, e aumento do *Tnfa*, quando comparado à dieta controle. Em relação aos colágenos III e IV no músculo esquelético, também houve aumento nos modelos submetidos à dieta hiperlipídica em comparação ao controle, ratificando que a dieta hiperlipídica favorece o surgimento de um perfil fibrótico no músculo esquelético. Isso pode ser explicado pelo aumento da síntese ou redução da degradação através das MMPs (KANG et al., 2011).

Glover e Phillips, (2010), realizaram uma revisão abordando o TF e a dieta apropriada para amenizar a perda de massa muscular e promover a hipertrofia muscular esquelética, observando que o TF exerce efeito protetivo contra a perda de massa e atrofia muscular induzida pela dieta hiperlipídica, através da

ativação da via de sinalização do eixo anabólico, composto por Igf1, Akt, P70S6K e MyoD.

Diante dos estudos apresentados, a dieta hiperlipídica pode modular o remodelamento muscular esquelético através do aumento exacerbado do tecido adiposo que, por conseguinte, vai liberar as citocinas pró-inflamatórias e aumentar o depósito de colágeno no músculo esquelético. Além disso, o perfil inflamatório reduz a expressão de MMP-2, causando um acúmulo de colágeno. Como consequência do aumento nos níveis de colágeno, foram observadas alterações nas habilidades motoras físicas, relacionadas ao declínio funcional. Portanto, a dieta hiperlipídica afeta o metabolismo e a homeostase de tecidos. Nesse caso, um desequilíbrio entre síntese e degradação de constituintes proteicos é observado, promovendo alterações na homeostase da matriz que resultam em perturbações funcionais. Sendo assim, espera-se que o TF realizado pelo pai tenha um efeito protetivo intergeracional na prole submetida à dieta hiperlipídica.

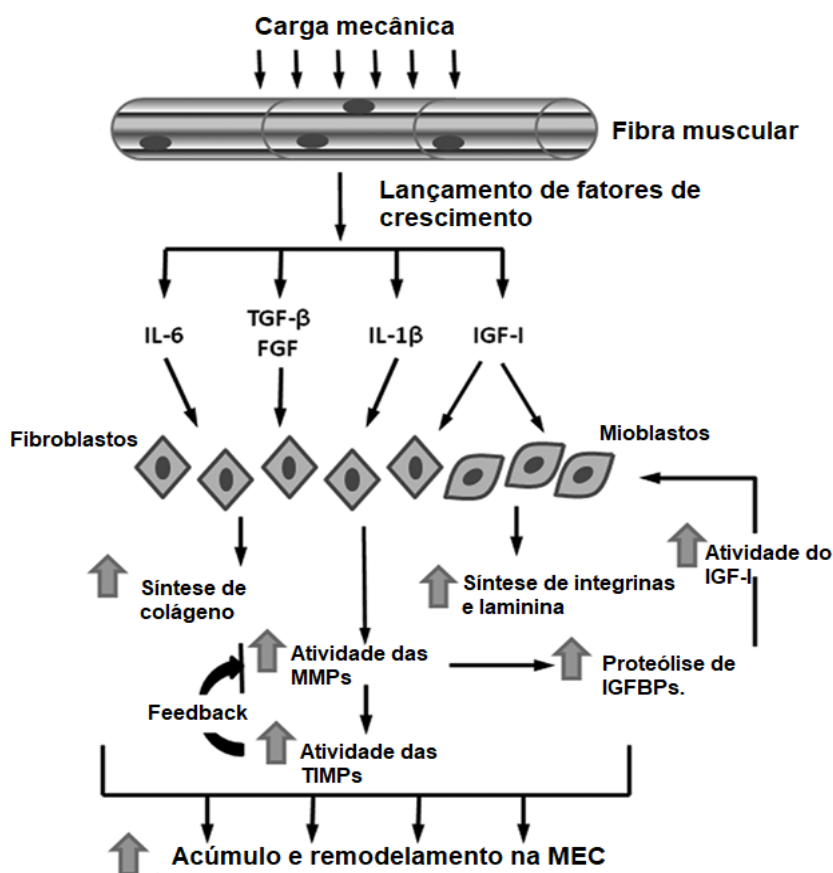
### **2.3 Treinamento de força e matriz extracelular no músculo esquelético**

O músculo esquelético sofre aumento da massa muscular como resposta à estímulos mecânicos. A fibra muscular é composta internamente por unidades menores denominadas miofibrilas. Essas unidades são compostas por sarcômeros, que representam a unidade contrátil do músculo esquelético, formada por unidades repetidas em série e paralelo. O sarcolema, uma membrana impermeável aos fluidos em condições normais, envolve a fibra muscular, que está suportada pela membrana basal. Localizadas entre a membrana basal e o sarcolema estão as células satélites, que possuem grande capacidade de renovação, proliferação e diferenciação, desempenhando, assim, funções fundamentais no crescimento, regeneração e reparo muscular (CARMELI et al., 2004).

Há evidências de que o treinamento físico realizado por roedores durante o TF, natação, corrida voluntária na roda ou esteira promove adaptações metabólicas e estruturais positivas para o músculo esquelético (ALLEN et al., 2001; HORNBERGER; FARRAR, 2004). Estudos prévios mostraram que o treino aeróbio modula a expressão de genes relacionados à síntese e degradação da

MEC intramuscular como COL1A1 e COL3A1 e MMP-2, respectivamente (VAN DER HEIJDEN et al., 2015; ZANCHI et al., 2010). Já a expressão do gene Ctgf também estimula a síntese de colágeno tipo I e de outras proteínas da MEC, apenas sob o estímulo de carga mecânica, proveniente do exercício físico (PEVIANI et al., 2018).

A síntese de colágeno na MEC depende de hormônios regulatórios e fatores de crescimento. Esses elementos, junto com as integrinas, o citoesqueleto e alguns canais iônicos, podem ser responsáveis pela sinalização celular induzida mecanicamente pelo exercício físico. Entretanto, o exercício por si só não é capaz de proporcionar alterações na MEC, exceto se houver a ação de fatores de crescimento. Fatores como Tgfb1, Il1, Il6, Il8, Igf1, fator de crescimento fibroblástico (FGF), prostaglandinas e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) apresentam efeitos positivos na ativação dos fibroblastos e estão representados na Figura 12 (PUFE et al., 2001).



**Figura 12.** Representação ilustrativa dos mecanismos relacionados às alterações na MEC do músculo esquelético induzidas pela sobrecarga mecânica. → Representa ativação/estímulo; ⊥ representa inibição. As setas cinzas indicam

estímulo total de processos que resulta na regulação positiva de vias de sinalização. Adaptado de Grzelkowska-Kowalczyk (2012).

A Il6 é uma citocina produzida pelo músculo esquelético, diferente das células imunes periféricas. O TF ativa a transcrição do gene Il6 no músculo que está produzindo a contração, sendo a proteína Il6 expressa transitoriamente nas fibras musculares e liberada na circulação durante o exercício. Além da interleucina mencionada, o Tnfa é considerado uma citocina pró-inflamatória clássica liberada em resposta ao dano muscular, que estimula a resposta pró-inflamatória através da ativação das células imunes. O aumento da concentração dessa citocina não é observado no TF moderado, embora possa aparecer como resposta a exercícios extenuantes ou prolongados. Portanto, a resposta da Il6 ao exercício não é um fenômeno referente a dano muscular esquelético (DOCHERTY et al. 2022),

Estudos experimentais utilizando modelo animal mostram que 48h pós exercício há aumento da atividade das enzimas relacionadas ao colágeno – procolágeno aminoprotease e procolágeno carboxiprotease. Além disso, considerando estudos envolvendo humanos e animais, a ideia de que há a ativação simultânea da formação e degradação do colágeno em resposta à sobrecarga tem sido sustentada (MERLY et al., 1999; REES et al., 2000). Curiosamente, as alterações na atividade de tais enzimas são acompanhadas pelo aumento de colágeno e hidroxiprolina, um dos principais aminoácidos constituintes da molécula de colágeno. Também foi observado que a modulação positiva dessas enzimas persistiu até 3 semanas após o TF. Também foi observado o aumento da expressão gênica de COL1A1, COL3A e do colágeno tipo IV nas 6 primeiras horas após o término do TF (MYLLYLÄ et al., 1986; VIHKO; SALMINEN; RANTAMAKI, 1978).

O mTOR é um importante regulador do tamanho muscular e sinalizador das vias de diferenciação e controle celular. Existe como parte de dois complexos multiproteicos, sendo eles: o mTORC1, que proporciona sensibilidade à rapamicina S6K e é necessário para sinalizar à P70S6K e 4E-BP1; mTORC2, insensível à rapamicina e necessário para sinalizar à Akt-Foxo. Portanto, a resposta de remodelamento muscular que ocorre mediante estímulo mecânico depende de mTOR (BODINE et al., 2001). Essas vias de sinalização

parecem controlar a síntese proteica através do aumento da tradução de RNAs específicos, resultando no aumento da fibra muscular (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A síntese de proteínas musculares e os aumentos iniciais na síntese proteica são acompanhados por sinalização da tradução. Os aumentos induzidos pelo TF na síntese de proteínas musculares e, conseqüentemente, na massa muscular, podem ser elucidados pelas mudanças na tradução (ativação de ribossomos) e na capacidade da tradução (abundância de ribossomos). O Alvo Mecanicista/Mamífero de Complexo de Rapamicina 1 (mTORC1) é um potente regulador da hipertrofia muscular e primordial para aumentar a tradução, além de também parecer importante para o início da transcrição. Em resposta a estímulos anabólicos, como exercício e aminoácidos, os efetores de mTORC1, sendo eles o S6K1 e 4E-BP1, são fosforilados, ocasionando a formação de uma pré-iniciação da tradução e iniciação da síntese proteica (HOLZ et al., 2005; KUBICA et al., 2005).

West et al. (2016) mostraram duas grandes descobertas ao realizarem um estudo com ratas de 10 meses de vida em dois grupos com 5 animais cada, sendo um dos grupos submetido a um protocolo de TF. A primeira, foi observar que o TF estimulou um rápido e sustentado aumento da fosforilação de S6K1, retornando aos níveis basais entre 18 e 36h, apesar da síntese proteica ainda estar elevada no período de tempo compreendido entre 15h e 18h. Houve, portanto, uma prolongada elevação da síntese proteica após o TF. Nesse estudo, a sinalização de mTORC1 retornou aos níveis basais por 18h, quando a síntese proteica ainda estava no seu pico, sugerindo duas possibilidades: altos níveis de síntese proteica no final do período de recuperação resultaram do aumento anterior da atividade de mTORC1, ou que mTORC1 não foi necessário para haver o aumento tardio da síntese proteica. Outra importante descoberta realizada pelos autores foi identificar que os marcadores de biogênese do ribossomo aumentaram entre 12 e 36h após o TF. Chaillou; Kirby; McCarthy, (2014); Goodman et al. (2011) reforçaram essa descoberta em seus estudos, pois mostraram que o TF estimula a biogênese do ribossomo, fundamental na regulação da massa muscular.

A ativação de P70S6K induzida pela contração muscular é dependente do mTOR. Conseqüentemente, a ativação de mTOR é imprescindível para o crescimento muscular induzido pelo TF, demonstrado pela atenuação de

respostas hipertróficas e síntese de proteínas através da rapamicina, inibidor de mTOR. Além disso, a regulação da degradação de proteínas musculares depende especialmente da atividade da via ubiquitina-proteassoma. Sob condições catabólicas, Atrogin-1 e Murf1 são os principais reguladores da proteólise do músculo esquelético. A degradação da miosina de cadeia pesada sofre regulação da ubiquitinação dependente de Murf1 (SANDRI et al., 2004). Nesse contexto, a ativação (desfosforilação) de fatores de transcrição Foxo acarretará a suprarregulação transcricional de Atrogin-1 e Murf1 (SANDRI et al., 2004). A atividade de Foxo é regulada especialmente através de modificações pós-traducionais que determinam a localização subcelular do mesmo. Nesse sentido, a fosforilação por Akt promove a exportação de Foxos do núcleo para o citoplasma. Sendo assim, Akt é fundamental para o equilíbrio da síntese e degradação das proteínas musculares. Essa via está bem definida na atrofia muscular.

Estudos realizados por Coffey; Hawley, (2007); Louis et al. (2007) e Louis 2007 mostraram que a expressão de RNAm de Murf1 como resposta de exercícios aeróbios ou TF é elevada 2 a 4h após a conclusão do exercício (recuperação), ao passo que o RNAm de Atrogin1 tende a aumentar no início da recuperação e diminuir posteriormente (depois de 12h).

O exercício físico é capaz de afetar agudamente e cronicamente as concentrações dessas enzimas, sendo a MMP-2 um dos principais marcadores analisados em estudos envolvendo humanos e exercício físico (LUCOTTI et al., 2011; URSO et al., 2009). Pesquisas evidenciam que os níveis de MMPs aumentam no período agudo após uma sessão de exercício físico aeróbio, indicando possivelmente uma participação das mesmas nas fases iniciais relacionadas à adaptação (KOSKINEN et al., 2001a; URSO et al., 2009). Nesse caso, os fatores que determinam as respostas moleculares são intensidade, duração, frequência e modalidade do exercício praticado (EGAN; ZIERATH, 2013; HOLLOSZY; COYLE, 2016).

Segundo Souza et al. (2014), foi observada uma maior expressão gênica de MMP-2 nos bíceps de ratos no grupo submetido ao TF, quando comparado ao grupo controle (sedentário). Além disso, no mesmo estudo, os autores relataram maior atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio de ratos obesos treinados quando comparado ao grupo controle (obesos), que não foi submetido



ao treinamento, o que favorece o remodelamento da MEC intramuscular especialmente pela degradação de colágenos, aumentados na presença de dieta hiperlipídica. Esses resultados sugerem que o TF é capaz de reverter os efeitos deletérios provenientes da dieta hiperlipídica a nível de degradação de colágenos, proporcionando um remodelamento da MEC intramuscular.

Já a expressão gênica dos TIMPs inibe a atividade das MMPs. O TIMP-2 é capaz de inibir a atividade preferencialmente da MMP-2. A pró-MMP-2 é regulada positivamente nos níveis pré e pós-traducionais após a realização do TF, sugerindo um aumento na degradação do colágeno (KOSKINEN et al., 2002, 2001a). Os TIMPs também são ativados simultaneamente às MMPs em resposta ao TF, sugerindo um efeito compensatório e modulador em decorrência da ativação da degradação. Sendo assim, a atividade das MMPs precede a atividade dos TIMPs, de tal maneira que estes servem como reguladores de degradação (KJÆR, 2004).

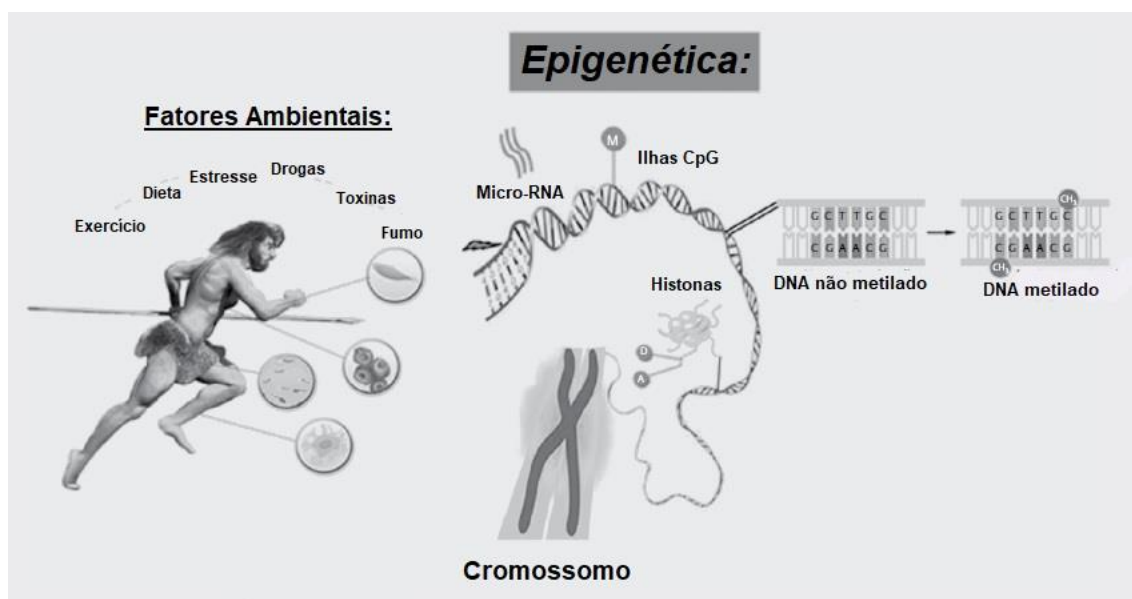
Segundo os estudos apresentados, o TF modula positivamente a expressão de genes relacionados à síntese e degradação da MEC intramuscular, sendo que estas ocorrem simultaneamente em resposta à sobrecarga mecânica. Além disso, sabe-se que a síntese de elementos constituintes da matriz só ocorre mediante a presença de fatores de crescimento. Todavia, grande parte dos registros acerca da expressão gênica neste tecido são decorrentes de estudos sobre o treinamento aeróbio e genes metabólicos (Beavers; Brinkley; Nicklas, 2010; Street; Hawley, 2016), sendo necessária a realização de estudos que investiguem a influência do protocolo de TF sobre a expressão de genes relacionados ao remodelamento do músculo esquelético e potenciais efeitos protetivos na exposição à dieta hiperlipídica, alvos do presente estudo.

#### **2.4 Exercício físico paterno como agente intergeracional modulando o músculo esquelético da prole**

Epigenética é o ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que trazem o fenótipo. Atualmente, a metilação do DNA e das histonas, assim como a expressão de pequenas moléculas de RNA (micro-

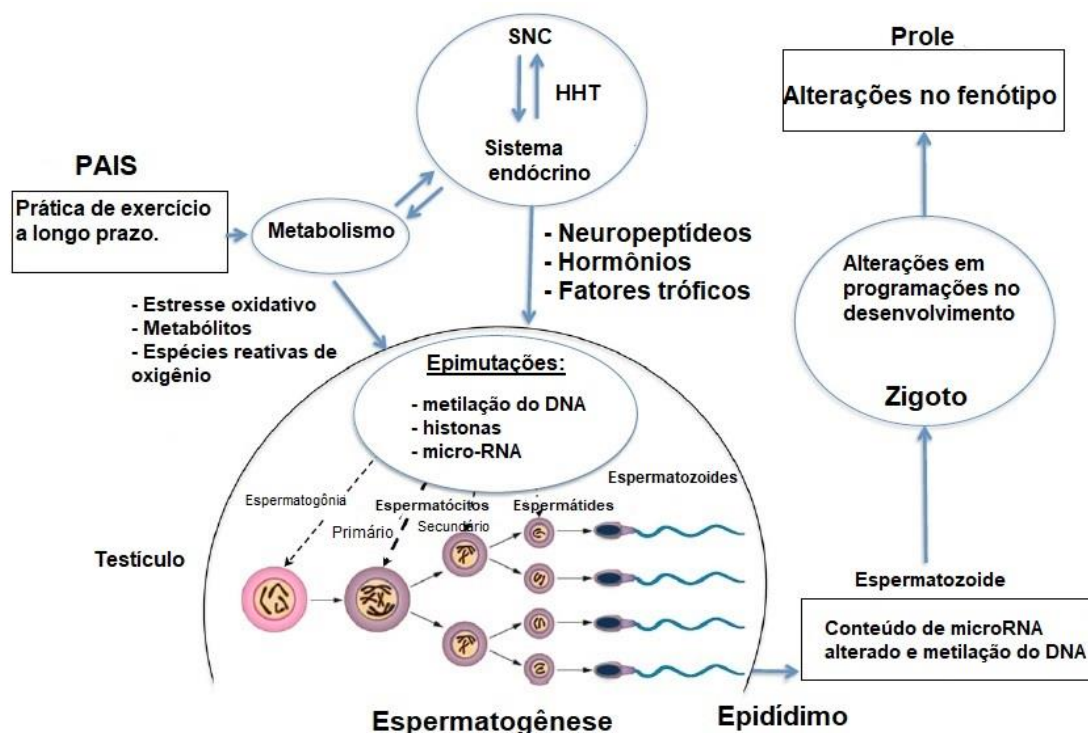
RNAs), representam os potenciais mecanismos intergeracionais mais estudados (WADDINGTON, 2012; ZIMMER; BLOCH, 2015).

Dos processos apresentados, a metilação (adição de um grupo metil) da base citosina dentro do DNA é a maior modificação epigenética que silencia a expressão gênica. A hipermetilação (adição de vários grupos metil) das ilhas CpG (5'-Citosina-fosfato-Guanina-3') ricas em citosina ocorre com frequência e está relacionada à supressão de genes. As proteínas metiladas das histonas que são de ligação ao DNA interagem com as ilhas de CpG (Figura 13), tornando o DNA inacessível para a transcrição de alguns genes relevantes. Além disso, recrutam enzimas que desencadeiam modificações epigenéticas inibitórias. Adicionalmente, demonstrou-se que moléculas de RNA também podem ser afetadas pela metilação, todavia ainda não se sabe quais são as implicações decorrentes disso. Ainda, há a hipometilação (perda do grupo metil ligado ao nucleotídeo citosina) no DNA, capaz de promover a ativação gênica (LI; ZHANG, 2014; ZIMMER; BLOCH, 2015).



**Figura 13.** Representação ilustrativa dos eventos epigenéticos que regulam a atividade genética sem alterar a sequência do DNA. Genes diferentes são expressos em função de marcas associadas com a metilação do DNA, assim como através de alterações na estrutura e composição da cromatina. Adaptado de Tibana et al. (2017).

Estudos mostram que o estilo de vida paterno, bem como sua exposição ao meio ambiente, podem impactar na espermatogênese e as células germinativas através do aumento na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides em homens que praticam exercício físico regularmente (MURASHOV et al., 2016; SAFARINEJAD; AZMA; KOLAH, 2009). Os possíveis mecanismos relacionados a alterações na função reprodutiva masculina compreendem alterações no eixo hipotálamo-hipófise-testículo, estresse oxidativo, aumento da formação de radicais livres e danos ao DNA (MURASHOV et al., 2016). Esses processos provavelmente afetam a metilação do DNA, as modificações nas histonas e os níveis de micro-RNA nas células germinativas, podendo resultar na transmissão de características adquiridas para a futura geração, compreendendo processos epigenéticos demonstrados na Figura 14 (WIDMANN; NIESS; MUNZ, 2019).



**Figura 14.** Representação ilustrativa dos fatores epigenéticos que podem contribuir para o efeito transgeracional do exercício a longo prazo no fenótipo da prole. O período crônico do exercício pode afetar o metabolismo e o eixo hipotálamo-hipófise-testículo nos pais, causando epimutações durante a espermatogênese. Provavelmente, as epimutações incluem a metilação do DNA, alterações nas histonas e RNAs não codificantes nas células germinativas

masculinas, podendo resultar na alteração do fenótipo na prole. Adaptado de Murashov et al. (2016).

Barrès et al. (2012), em um estudo que envolveu a realização de exercícios incrementais à fadiga volitiva (realizar o máximo de esforço até a fadiga) com homens sedentários utilizando um cicloergômetro, sendo realizada a biópsia do músculo vasto lateral 3 horas após o término do exercício de 80% (alta intensidade) da capacidade aeróbia máxima. Foi observada uma hipometilação dos genes metabólicos Pgc1a (co-ativador de transcrição gênica 1 $\alpha$ ), com efeito protetivo sobre a atrofia muscular; TFAM (fator de transcrição mitocondrial A), que também possui efeito protetivo sobre a atrofia muscular, MEF2A (fator estimulador específico para miócitos 2A), que participa da produção de sarcômeros e controle do tipo de fibra; assim como o PDK4 (piruvato desidrogenase quinase 4), gene importante para a regulação do metabolismo ao controlar a oxidação de ácidos graxos e glicose durante os exercícios físicos; imediatamente após o exercício, enquanto houve hipometilação do gene Ppard (proliferador de peroxissomo ativado por receptor  $\delta$ ), um importante regulador do metabolismo do músculo esquelético, além ser um regulador do tipo de fibra muscular e um possível mediador das adaptações observadas no músculo em resposta ao exercício); 3 horas após o término do exercício, mostrando que a fase aguda promove a expressão gênica. Esses achados demonstram que o exercício aeróbio é capaz de melhorar o perfil metabólico do músculo esquelético no indivíduo que pratica o treino, possivelmente melhorando a função muscular através de modificações morfológicas.

Sugere-se que a hipometilação do DNA é um mecanismo transitório envolvido na síntese de RNA. A análise dos níveis de RNA do músculo esquelético relatou diferenças geracionais e ligadas ao sexo nos níveis de RNAm para diversos genes metabólicos, incluindo os níveis de HK2 (hexoquinase 2), a expressão desse gene aumenta com o exercício físico e a produção de insulina; Ppard; PPARGC1A (codifica Pgc1a), cujo efeito é protetor sobre a atrofia muscular; Adipoq (adiponectina), combate os danos celulares, enfraquecendo a inflamação; e SCD1 (dessorase de estearoil-CoA 1), que afeta a sensibilidade à insulina (BARRÈS et al., 2012). Em outro estudo do mesmo grupo, (2009), foi

observado que a metilação do DNA permaneceu inalterada 48 horas após realização de um programa de treinamento físico de 3 semanas, enquanto a expressão de RNA referente ao co-ativador de transcrição gênica 1 $\alpha$  (Pgc1a) e fator de transcrição mitocondrial A (TFAM, possui efeito protetor sobre a atrofia muscular) aumentaram.

Nos estudos de Murashov et al. (2016) envolvendo ratos treinados de forma aeróbia em roda (corrida voluntária) durante 12 semanas, houve alteração na expressão de genes metabólicos no músculo esquelético da prole, como PDK4; SLC2S, proteína transportadora de glicose; H19 (transcrição impressa da maternidade), cujo impacto é negativo na regulação do peso corporal); PTPN1 (proteína tirosina fosfatase 1), regulador negativo da sinalização da insulina que está envolvido no controle da homeostase da glicose e no gasto energético muscular esquelético; OGT ( $\beta$ -N-acetilglucosamina transferase ligada ao O), relacionado à atrofia muscular esquelética; e OGA (O-GlcNAcase), importante para homeostase da energia muscular e relacionado à atrofia muscular esquelética. Houve uma diminuição na metilação do gene H19. Essas modificações epigenéticas na expressão de genes metabólicos e micro-RNAs indica que o exercício realizado pelo pai antes da fecundação pode alterar o fenótipo metabólico da prole, afetando especialmente o epigenoma. Portanto, esse estudo demonstrou que a prática da corrida voluntária na roda por machos reprogramou o fenótipo da geração seguinte de forma positiva, melhorando o funcionamento metabólico da musculatura esquelética e, provavelmente, a função muscular como consequência.

Ainda segundo Murashov et al., (2016), os ratos treinados durante 12 semanas de forma aeróbia, correndo voluntariamente na roda, mostraram uma expressão diminuída no RNAm de um gene importante para a regulação negativa da oxidação de glicose, importante por participar da geração de energia no músculo esquelético. Esse importante gene, que é o PDK4, estava reduzido no músculo esquelético da prole de ratos exercitados, aumentando a produção muscular de energia. A expressão diferencial de micro-RNAs é uma forma de reprogramação epigenética nos espermatozoides, que pode ter colaborado para alterações no fenótipo ao se ligarem no RNAm do gene PDK4, silenciando-o no músculo esquelético da prole de animais exercitados. Esses dados são compatíveis com as evidências humanas que sugerem a expressão do RNAm

de PDK4 ser epigeneticamente regulada e diminuir após a realização do exercício físico, aumentando o fornecimento de energia muscular e, conseqüentemente, o desempenho durante o exercício físico.

Assim como as adaptações musculares ocorrem conforme a especificidade do exercício, acredita-se que os efeitos epigenéticos também dependam da intensidade do treino. Nesse caso, maior intensidade leva a maior hipometilação e hipermetilação (BARRÈS et al., 2012). Todavia, em ratos, o aumento da expressão de RNAm do Pgc1a ocorre na ausência das alterações na promoção de metilação e hidroximetilação (adição do radical hidroxil junto ao metil) no DNA, contrastando com a trimetilação (adição de três grupos metil) da histona-3 lisina-4 (H3K4). Essa modificação na histona indica que a transcrição está ativa e ocorre após exercícios com alta intensidade (LOCHMANN et al., 2015).

Considerando as histonas, a conexão entre os aminoácidos contidos nessas estruturas e o DNA ocorre por forças de atração entre as cargas do DNA e os aminoácidos. Modificações pós-traducionais nestes aminoácidos podem neutralizar as cargas positivas, tornando o DNA mais acessível e menos compacto, como também pode criar outros locais para ativação gênica e silenciar proteínas (KOUZARIDES, 2007; ZIMMER; BLOCH, 2015). Poucos estudos conseguiram estabelecer com sucesso uma relação entre alterações nas histonas nos espermatozoides e alterações intergeracionais, como foi pontuado por Champroux et al., (2018).

Willkomm et al. (2017) identificaram que após treino de alta intensidade exigindo resistência metabólica, houve redução da trimetilação da H3K4 (processo que regula a proliferação e diferenciação das células satélites). Já que a H3K4me3 parece promover a expressão de genes específicos da estrutura do músculo, a função desse mecanismo ainda permanece desconhecida, uma vez que a expressão reduzida de genes miogênicos deveria prejudicar a adaptação muscular em decorrência do exercício. Ainda, Ohsawa et al (2018) sugeriram que há também modificações em outras histonas além das ocorridas na H3 que participam das adaptações na estrutura do músculo esquelético induzidas pelo exercício. Os autores demonstraram que um treino de esteira com duração de várias semanas apresentou efeito significativo na trimetilação da histona 4 na lisina 20 (H4K20me3), aumentando no grupo 1 (corrida 30min/dia) e diminuindo

no grupo 3 (corrida 60min/dia), sugerindo que o treinamento aeróbio de alta intensidade é capaz de modular as modificações nas histonas, interferindo positivamente em mecanismos intergeracionais.

Outro mecanismo epigenético é a expressão de micro-RNAs – nucleotídeos longos –, que são moléculas de RNAs não codificantes que regulam as adaptações musculares ao exercício físico. São pequenas moléculas de RNA que podem se ligar ao RNAm complementar, inibindo sua tradução e induzindo a sua degradação (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009). Divergindo da ideia de que o micro-RNA contempla apenas propriedades inibitórias, demonstrou-se que estas moléculas também são capazes de ativar processos de tradução (ZIMMER; BLOCH, 2015).

O exercício regula várias classes de micro-RNAs nos espermatozoides, apontando essas pequenas estruturas como potenciais mediadores dos efeitos da dieta paterna na próxima geração (STANFORD, NAWROCKI et al., 2018). A capacidade do exercício reverter a produção de micro-RNAs e suprimir fenótipos metabólicos na prole está relacionada à hipótese de que esses RNAs no espermatozoide podem participar da transmissão de informações ambientais paternas para as próximas gerações (STANFORD, NAWROCKI et al., 2018).

Os micro-RNAs, contidos nos espermatozoides, são enviados ao óvulo durante a fertilização. Dessa forma, mesmo mantendo a sequência de DNA inalterada, as mudanças ambientais podem afetar a próxima geração através dos micro-RNAs, que regulam a expressão gênica através do pareamento com o RNAm, ocasionando o frequente silenciamento do gene (DENHAM, 2018; YAN et al., 2011). Ainda, a prática prolongada de exercícios físicos altera o conteúdo de micro-RNA no espermatozoide (MCLEAN et al., 2015).

No modelo animal, registrou-se que 7 dias praticando treinamento de resistência aumenta a quantidade de mitocôndrias no músculo esquelético, bem como a expressão de Pgc1a, TFAM e FOXJ3 (fator de transcrição nuclear J3), responsável por regular o tipo de fibra muscular esquelética no adulto na regeneração muscular; diminuindo a quantidade de micro-RNA-494 (pequeno RNA envolvido na regulação pós-transcricional da expressão gênica, codificado pelo gene MIR494) (YAMAMOTO et al., 2012; NIELSEN et al., 2010; RUSSELL et al., 2013).

De acordo com o estudo realizado por Stanford et al. (2018) com ratos durante 3 semanas em treino aeróbio utilizando corrida voluntária em rodas (com acesso livre à roda durante o dia todo), a prática do exercício pelo pai antes da fecundação suprime os efeitos do consumo da dieta hiperlipídica pela prole, revertendo o impacto na tolerância à glicose, bem como o percentual de gordura e aumentando a captação de glicose em vários músculos esqueléticos da prole. O sequenciamento dos espermatozoides no modelo animal revelou que os efeitos da dieta hiperlipídica observados nos micro-RNAs espermáticos associados a vias de metabolismo primário (aumento da quantidade dos seguintes RNAt (transporta os aminoácidos que serão utilizados na síntese das proteínas até os ribossomos) e suas sequências de anticódons: RNAt-Gli-GCC, RNAt-Gli-CCC e RNAt-His-GTG) são suprimidas pelo treinamento físico. Quando esses micro-RNAs foram modificados, houve melhora na captação de glicose em vários músculos esqueléticos. A melhora no metabolismo do músculo esquelético acarreta a melhora na função muscular, sugerindo que o treinamento aeróbio realizado pelo pai é eficaz em melhorar a função muscular da prole através de alterações metabólicas positivas no músculo esquelético da geração seguinte, protegendo a prole dos efeitos deletérios intramusculares ocasionados pelo consumo de dieta hiperlipídica.

Krout et al. (2018) relataram em ratos que o exercício realizado pelo pai antes da fecundação (2 semanas de corrida voluntária na roda) foi capaz de prevenir o aumento do risco de diabetes tipo 2 na prole após consumo paterno de dieta hiperlipídica. Esse efeito protetivo pode ocorrer em função do aumento da expressão das vias de sinalização da insulina no músculo esquelético da prole. Um mecanismo possível de reprogramação epigenética envolvendo o músculo esquelético da prole através da dieta hiperlipídica e exercícios paternos pode ser por influência do aumento de tecido adiposo gonadal, já que esse tecido é capaz de alterar a função biológica dos espermatozoides. Considerando o outro mecanismo, o pai que consumiu dieta hiperlipídica e que praticou exercício deve sofrer alterações epigenéticas nos espermatozoides, que afetam as vias de sinalização da insulina no músculo esquelético da prole, melhorando-as. Esses achados ratificam os registros na literatura sobre o treinamento aeróbio ser capaz de proteger o músculo esquelético dos efeitos metabólicos deletérios decorrentes do consumo de dieta hiperlipídica, melhorando o metabolismo



intramuscular. Além disso, o treinamento aeróbio realizado pelo pai também parece ser eficaz em proteger a prole do surgimento de diabetes tipo 2 ocasionado pelo consumo paterno de dieta hiperlipídica.

Nesses estudos, Stanford et al. (2018) e Krout et al. (2018) apontaram que a resistência à insulina e a dificuldade de captação de glicose impactam em toda a maquinaria do músculo esquelético, modificando a função muscular. Na exposição à dieta hiperlipídica, o comprometimento do metabolismo intramuscular está ligado à MEC e a alterações no remodelamento, diminuindo a plasticidade muscular. Nesse contexto, o TF é uma ferramenta importantíssima para melhorar as vias de remodelamento na MEC intramuscular. Sousa Neto et al. registraram que o TF foi capaz de melhorar as vias de remodelamento no tendão (Sousa Neto et al., 2020a) e no coração (DE SOUSA NETO et al., 2020b). No entanto, ainda não foi elucidado se há melhora nas vias de remodelamento da MEC muscular esquelética.

Um crescente corpo de evidências mostra que os efeitos benéficos mediados pelo exercício são hereditários. O exercício realizado pelos pais pode alterar o desenvolvimento das gerações futuras e representa um potente regulador da herança intergeracional através das adaptações epigenéticas. Investigações que elucidam os efeitos protetores do treinamento parental estão chamando a atenção para sua ligação com a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis durante o desenvolvimento da prole. O exercício, como uma intervenção nos pais antes da concepção, melhora os resultados metabólicos e é uma das formas econômicas de melhorar a saúde da prole. A proteção das futuras gerações deve ser uma consideração primordial, pois pode contribuir para uma série de implicações para a saúde da prole durante a idade adulta.

O exercício físico paterno pode promover alterações na expressão de genes metabólicos na prole, aumentando a produção de energia e o desempenho muscular esquelético. Tais modulações podem ocorrer através da metilação do DNA espermático paterno, das alterações nas histonas e do conteúdo de micro-RNA que também pode silenciar genes (MURASHOV et al., 2016). Contudo, até o presente momento são desconhecidos os mecanismos acerca da influência intergeracional do TF nas adaptações da musculatura esquelética da prole. Por isso, o presente estudo busca investigar os efeitos do TF paterno e as adaptações no tecido muscular da prole submetida à dieta

hiperlipídica, verificando se o TF exerce um efeito protetivo na prole sobre as alterações ocasionadas pela dieta hiperlipídica.

### 3. JUSTIFICATIVA

As demandas impostas ao músculo esquelético durante o TF são responsáveis pela sinalização intra e intercelular, essenciais para que ocorram as adaptações ao exercício (HAWLEY et al., 2014). Evidências apontam para um extenso remodelamento na MEC intramuscular, além de modificações nos perfis inflamatório e metabólico, vias de síntese e degradação durante a regeneração muscular, que ocorre após a prática do exercício físico (FERNANDES; PAULA; SOCI, 2008; VAN DER HEIJDEN et al., 2015). Outro fator que modifica a homeostase da MEC e do músculo esquelético é a dieta hiperlipídica, resultando no aumento da expressão de genes relacionados ao colágeno e diminuição da expressão de genes relacionados à inibição dessa proteína estrutural (CARMELI et al., 2004; CESARI et al., 2005).

Em relação aos efeitos intergeracionais, o remodelamento na MEC do músculo esquelético também é observado na prole de pais que praticaram exercício físico antes da fecundação e ocorre através de vias epigenéticas (metilação do DNA, modificações pós-traducionais que ocorrem nas histonas e expressão de micro-RNAs), responsáveis por modular a expressão de proteínas e a atividade enzimática, assim como alterar as vias inflamatórias e metabólicas, e vias de síntese e degradação (SOUSA NETO et al., 2020a; SOUSA NETO et al., 2020b).

No entanto, ainda não há evidências que indiquem como o TF paterno poderá proporcionar efeitos benéficos sobre a expressão dos genes relacionados à MEC intramuscular da prole, como também não há sobre o remodelamento no músculo esquelético das proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica, já que existem limitações na literatura relacionada à prole cujo pai realizou exercícios físicos antes da fecundação (MURASHOV et al., 2016).

Nesse contexto, o presente projeto pretende investigar o papel do treinamento de força praticado pelo pai como ferramenta que contribui de forma não farmacológica para proteger a prole dos efeitos deletérios na MEC e no músculo esquelético ocasionados pelo consumo de dieta hiperlipídica, além de demonstrar uma nova ótica da importância do exercício físico para a saúde das gerações futuras.

## 4. HIPÓTESE

A hipótese desse estudo foi de que os pais submetidos ao treinamento de força apresentassem maior remodelamento do músculo gastrocnêmio, com maior atividade da MMP-2, diminuição da expressão de genes relacionados à atrofia muscular e aumentando os genes relacionados à síntese proteica.

Esperamos que a prole submetida à dieta hiperlipídica apresentasse remodelamento muscular reduzido considerando as análises da expressão gênica e proteínas importantes para esse processo, como a atividade das MMPs, e genes associados à manutenção, homeostasia e remodelamento do músculo gastrocnêmio quando comparado à prole submetida à dieta controle.

Por outro lado, esperamos que o treinamento de força paterno desencadeasse benefícios ou fatores de proteção no músculo gastrocnêmio da prole independentemente do tipo de dieta administrada, diminuindo a expressão de genes relacionados à adipogênese, além dos que levam à atrofia muscular, aumentando a expressão de genes que desencadeassem a síntese proteica, bem como acarretasse o aumento na expressão de genes fundamentais para a manutenção da MEC do gastrocnêmio, e aumentasse a atividade da MMP-2, fundamental para o remodelamento da MEC.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Investigar os efeitos do treinamento de força paterno sobre as alterações moleculares relacionadas ao remodelamento muscular esquelético (músculo gastrocnêmio) nas proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica.

### Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar os efeitos do TF sobre a atividade das vias de síntese (Akt1, Myod e P70S6K), vias de atrofia (Foxo1, Atrogin1 e Murf1), vias inflamatórias (Tnfa, Tweak, Il6 e Nfkb), fator de transcrição adipogênico (Cebpa), fator de transcrição regulador de metabolismo lipídico e inflamatório (Ppara), proteínas estruturais e enzimas de remodelamento de matriz (COL1A1, COL3A1 e MMP-2), fatores de crescimento (Tgfb1, Ctgf e Igf1a), citocinas pró-inflamatórias e inflamatórias (Il8, Il10, Il12 e Tnfa).
- ✓ Avaliar se o treinamento de força paterno modifica a expressão gênica/atividade envolvida na inflamação muscular e remodelamento no músculo gastrocnêmio das proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica.
- ✓ Avaliar os efeitos do treinamento de força sobre os genes e expressão proteica/atividade envolvidas na inflamação muscular e remodelamento no músculo gastrocnêmio dos pais.
- ✓ Avaliar efeitos da dieta hiperlipídica e dieta controle na expressão proteica/atividade envolvida na inflamação e remodelamento muscular na prole (músculo gastrocnêmio).

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### Local e condição de permanência dos animais:

Os cuidados com os animais seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Católica de Brasília (CEUA – protocolo 010/13). Para a realização do estudo, o desenho experimental seguiu os seguintes passos:

### 6.1 Pais:

Primeiramente, ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, pesando  $359g \pm 32,42$ ), com 4 meses de idade, foram colocados em gaiolas coletivas (4 ou 3 ratos por gaiola), sendo divididos aleatoriamente em dois grupos (sete animais por grupo): pais sedentários (PS; não realizou TF, livre para se movimentar nas gaiolas) e pais treinados (PT; realizou TF). Os filhotes foram obtidos através de acasalamento com fêmeas sedentárias. Após as 8 semanas de TF paterno, o ciclo estral nas ratas foi verificado diariamente, e durante a fase de proestro, um macho e uma fêmea foram alojados juntos por dois dias consecutivos para acasalamento, com acesso livre a uma dieta controle (Purina®, Descalvado-SP, Brasil). Os grupos experimentais no presente estudo foram compostos por 28 filhotes machos. A ninhada era padronizada entre sete filhotes cada grupo para evitar ninhadas de tamanhos diferentes, que ficavam com as mães até o desmame. As ninhadas pertencentes ao mesmo grupo experimental eram descendentes de pais diferentes.

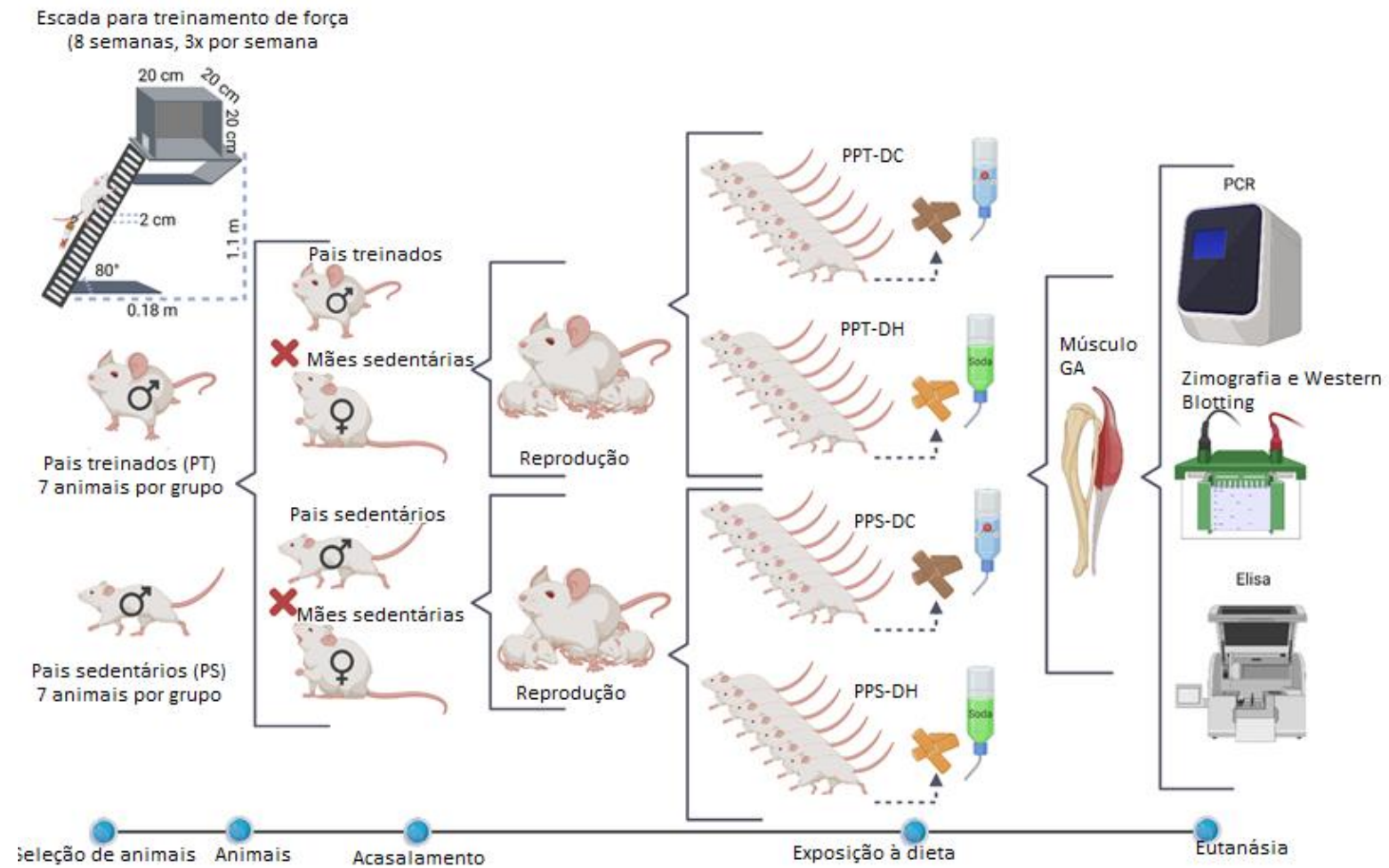
### 6.2 Prole:

Após o nascimento dos filhotes, os animais (apenas os machos) foram distribuídos em quatro grupos: prole de pais sedentários submetida à dieta controle (PPS-DC; n=7); prole de pais treinados submetida à dieta controle (PPT-DC; n=7); prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica (PPS-DH; n=7); e prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (PPT-DH; n=7). As fêmeas não foram incluídas, em função da natureza variável dos dados causada por flutuações hormonais associadas ao ciclo reprodutivo.

Os animais foram alojados e permaneceram em gaiolas de polipropileno (máximo de quatro ratos por gaiola) a uma temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com 12:12h ciclo claro-escuro.

Todos os animais eram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Educação Física da Universidade Católica de Brasília, onde os experimentos foram conduzidos.

O desenho experimental do estudo é apresentado na Figura 15:



**Figura 15.** Desenho experimental. Ilustração esquemática das etapas metodológicas do presente estudo. Adaptado de Sousa Neto (2021).



### **6.3 Treinamento de força paterno:**

O protocolo de TF foi adaptado de Hornberger e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo. Além disso, os procedimentos foram descritos em estudos realizados anteriormente (PRESTES et al., 2009; SOUZA et al., 2014). O TF de oito semanas foi realizado 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), das 14h às 16h. Inicialmente, os ratos foram adaptados ao protocolo de treinamento de força que exigiu que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2cm, inclinação de 80°) com pesos (falcon contendo pesos de chumbo) presos à cauda. O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. O tamanho da escada devia fazer com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. Para ambientação, os animais foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a escalada. Quando necessário, foi aplicado um estímulo com pinça na cauda do rato para iniciar o movimento desejado. Esse procedimento foi repetido até que conseguissem, de forma voluntária, realizar as escaladas seguintes sem qualquer estímulo. No topo da escada, os ratos deviam alcançar uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) e descansar por aproximadamente 120 segundos. As sessões de familiarização totalizaram três, com o intervalo de 48 horas entre as mesmas.

Três dias após a familiarização, realizou-se um teste de predição da carga de treino que consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal e descansar 120 segundos. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g (aproximadamente 13% do peso corporal) até uma carga com a qual os ratos não conseguissem escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguiu progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento dos ratos para a sessão de treinamento. As sessões de treinamento consistiram de oito escaladas na escada (TF), contendo duas séries com uma repetição cada, de 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal determinada na sessão anterior, e 120 segundos de descanso entre as séries.

Em cada semana, respeitando-se o Princípio da Sobrecarga Progressiva no treino, foram adicionados 30g (aproximadamente 13% do peso corporal do animal) referentes à quilagem da última semana na série com 100% da capacidade máxima de carregamento, objetivando garantir o estresse desejado decorrente do exercício.

#### **6.4 Controle da ingestão alimentar e massa corporal da prole:**

Durante todo o procedimento experimental, os animais tiveram acesso *ad libitum* à água filtrada e ração padrão para roedores. A massa corporal e o consumo alimentar da prole foram monitorados semanalmente, sendo pesados e registrados em balança eletrônica digital (Filizola®, São Paulo, Brasil), em gramas.

A dieta controle (normocalórica) foi composta por ração comercial destinada a roedores (Labina Presence®, Paulínia/SP, Brasil), com os seguintes macronutrientes: 66% de carboidratos, 24% de proteínas e 10% de lipídios (9,06%), totalizando 3,48 Kcal/g; água fornecida *ad libitum*). Os grupos PPS-DH e PPT-DH foram alimentados com uma dieta hiperlipídica (20,27% de carboidrato; 19,89% de proteínas; 59,38% de lipídios, (Prag soluções®), totalizando 5,20 Kcal/g; 200mL de refrigerante por semana (Coca-Cola®) (carboidratos: 21 g/L (100%); sódio: 10 mg/L, totalizando 0,85 Kcal/g) e água *ad libitum* após o 21º dia do nascimento e durante 6 meses (Tabela 1), objetivando acompanhar a prole até o estágio adulto. Estudos prévios mostraram a eficiência dessa dieta hiperlipídica no ganho de peso corporal e de tecido adiposo em ratos *Wistar* (MARINHO, 2014; GONÇALVES et al., 2018). O uso de refrigerantes por ratos é o complemento e caracterização da dieta hiperlipídica, além de ser uma estratégia eficaz para aumentar a ingestão energética total, assim como a massa corporal ao longo do tempo. O refrigerante industrializado é o elemento considerado para o desenvolvimento de um modelo *in vivo* de ganho de peso, proporcionando mais semelhança à fisiopatologia dos efeitos relacionados ao ganho de peso e obesidade em humanos (ALKHEDAIDE et al., 2016).

As mães também foram expostas à dieta controle (Purina®, Descalvado - SP, Brasil) durante toda a gestação e lactação. A quantificação do consumo

alimentar foi realizada a partir da equação: Quantidade ofertada – quantidade restante na gaiola ÷ pela quantidade de animais na caixa (TIBANA et al., 2018).

**Tabela 1.** Composição das dietas usadas no experimento.

Nutrientes	Dietas	
	Dieta controle (g%)	Dieta hiperlipídica (g%)
Proteínas	24	19,89
Lipídios	10	59,38
Carboidratos	66	20,27
Fibra (celulose)	5,0	6,46
Minerais	3,7	12,9
Vitaminas	1,9	1,29
Bitartarato de colina	0,2	2,60
Banha	0,0	3,16
Óleo de soja	0,0	3,23
Energia total (kCal/g)	3,48	5,2

SOUSA NETO, I. V. *et al.* Paternal Resistance Training Induced Modifications in the Left Ventricle Proteome Independent of Offspring Diet. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2020.

### 6.5 Eutanásia e coleta das amostras:

Após 48h do término do experimento, os animais foram sacrificados através da aplicação intraperitoneal de solução de xilazina (12mg/kg/peso corporal) e ketamina. Depois da eutanásia, as cabeças medial e lateral do gastrocnêmio foram removidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para análise posterior de MMPs e da expressão de genes relacionados ao remodelamento intramuscular.

### 6.6 Determinação da atividade de MMPs por zimografia:

O extrato tecidual de músculo foi testado para verificar a presença de atividade de metaloproteases através da técnica de zimografia, conforme descrito por Cleutjens (1995). As amostras foram homogeneizadas e incubadas em tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0; 0,15 M NaCl; 1µM ZnCl<sub>2</sub>; 20 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,5 mM NaN<sub>3</sub> e 0,01% de Triton X-100] (25 mg de tampão

para cada mg de tecido) a 4°C por um período de 24 horas. com o auxílio de cinco esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2,3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, Estados Unidos) e três partículas afiadas de carboneto de silício (1 mm) (BioSpec Products), utilizando o FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos). Após este tempo, a solução foi centrifugada (10 minutos, 4°C em 13000rpm) e o sobrenadante foi coletado. Um espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, Estados Unidos) foi utilizado para realizar a quantificação das concentrações proteicas.

Finalizada a extração proteica, as amostras foram concentradas em 30mg de proteína e 10mL de tampão de amostra sem b-mercaptoetanol (agente redutor) e homogeneizadas para serem adicionadas ao gel de corrida, que consistia em policriamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 1mg/mL (Figura 16) para eletroforese. Trinta mg de proteína total foram carregados em cada poço. Para identificação das isoformas latente, intermediária e ativa das MMPs, foram adicionados 5 µL do marcador de massa molecular pré-corado (SM0671 - *Fermentas*) em um dos poços.

Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes durante 20 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaN<sub>3</sub> 0,02% e ZnCl<sub>2</sub> 10 mM), a 37°C, por 18 horas. Após este tempo, foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. A pipetagem foi realizada pelo mesmo pesquisador a fim de reduzir as variáveis que pudessem resultar em erros, além dos géis terem sido preparados com as mesmas soluções. Ademais, a realização dos géis foi em remessa e as corridas duraram aproximadamente 5 horas e 30 minutos. As bandas de isoformas pró e ativas foram identificadas com o auxílio de técnica padrão usando o critério de peso molecular. As bandas encontradas em todos os grupos variaram entre 72-64 kDa. O programa ImageScanner III, Lab- digitalização 6.0 foi utilizado para determinar a atividade das metaloproteases pela densitometria das bandas. Além disso, a intensidade das bandas foi avaliada em pixels com o uso do programa Image Master 2D Platinum 7.0 *software*. Além disso, a normalização da proteína, a voltagem e o tempo durante a eletroforese, assim como o fundo de coloração do gel foram padronizados de forma cautelosa.



**Figura 16.** Representação ilustrativa da eletroforese, uma das etapas da técnica de Zimografia segundo Iwai et al. (2008). Amostras do músculo gastrocnêmio extraídas do modelo animal e 10  $\mu$ L de tampão de corrida inseridos nas cubas específicas para eletroforese.

### **6.7 Extração do RNAm e RT-qPCR:**

Para a extração do RNAm do músculo, as amostras foram transferidas para tubos pré-refrigerados contendo 5 esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2.3mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), 1 grão de sílica (BioSpec Products) e 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen - EUA) em agitação no equipamento FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals) na velocidade nível 4 por 15 segundos. Para obter uma homogeneização completa o processo foi repetido 5 vezes resfriando as amostras em gelo com água em cada ciclo (para evitar o aquecimento das mesmas). Um espectrofotômetro, NanoDrop® (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) foi utilizado para quantificar a concentração de RNA total extraído de cada amostra. Esta mesma

quantificação permitiu observar a qualidade das amostras, sendo estas escolhidas para dar continuidade ao experimento, amostras que apresentavam uma relação de absorbância A260 / A280 de entre 1,8 e 2,0.

Para evitar contaminação das amostras por DNA após extração, as mesmas foram tratadas com *TURBO DNA-freeKit* (Ambion – Life Technologies – 1907M) conforme recomendações do fabricante.

Para avaliar a expressão gênica do músculo gastrocnêmio, um total de 1µg de RNA, extraídos de cada amostra foram convertidos em cDNA (volume final 20 µL), usando-se a transcriptase reversa SuperScript® VILO™ MasterMix (Invitrogen- Cat. 11755-010), de acordo com o manual do fabricante. Para realizar a transcrição reversa, os seguintes parâmetros de ciclagem foram utilizados: (1) amostras incubadas à 25°C por 10 minutos; (2) amostras incubadas à 42°C por 60 minutos; (3) amostras incubadas à 85°C por 5 minutos. Ao final da reação as amostras foram armazenadas no freezer à uma temperatura -20°C.

Para as reações de RT-qPCR, um sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado conforme recomendações do fabricante GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega – A6102). Para tanto, foram homogeneizados 10µL de GoTaq Probe RT-qPCR Master Mix; 1µL do primer 20x do gene alvo (Tabela 2) e uma quantidade de cDNA que foi determinada conforme curva padrão padronizada para cada gene que variou de 8-40ng em um volume final de 20µL. Para a reação, os seguintes parâmetros de ciclagem térmica foram utilizados: (1) 40°C durante 15 minutos; (2) 95°C durante 2 minutos (3) 95°C durante 15 segundos; (4) 60°C durante 1 minuto perfazendo um total de 40 ciclos. A curva de *melting* foi analisada após o término da corrida para confirmar a especificidade dos produtos amplificados. A expressão relativa dos produtos de qPCR foi determinada com auxílio da equação a seguir:  $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK, 2001).

A reação de amplificação foi efetuada pelo Quant Studio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) para os seguintes genes: COL1A1, COL3A1, Ctgf, MMP-2, Tgfb1, TIMP-2, RPLP0 (Tabela 2). Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente em formato de duplicatas da mesma amostra de cDNA em uma única corrida. A expressão de cada gene alvo foi normalizada baseado na expressão do gene constitutivo RPLP0, que foi utilizado

como controle interno da expressão de RNAm devido a menor variabilidade intra e inter grupo em comparação com os outros genes constitutivos testados nesse estudo, sendo eles o beta-actina e o Gapdh.

É importante salientar que a eficiência de reação de cada gene analisado no presente estudo foi determinada através de uma curva de padronização que apresentou parâmetros-referenciais de slope igual a -3.3,  $R^2 = 0.9-1.0$  demonstrando eficiência acima de 90%.

**Tabela 2.** Lista dos genes alvos associados à matriz extracelular, inflamação, metabolismo e miogenese:

RNAm	CÓDIGO (LIFE TECHNOLOGIES)
<i>Actb</i>	rn00667869
<i>Akt1</i>	rn00583646
<i>Atrogin1</i>	rn00591730
<i>Cebpa</i>	rn00560963
<i>COL1A1</i>	rn01463848
<i>COL3A1</i>	rn01437681
<i>Ctgf</i>	rn01537279
<i>Foxo1</i>	rn01494868
<i>Gapdh</i>	rn01775763
<i>Igf1a</i>	rn00710306
<i>Il6</i>	rn01410330
<i>Murf1</i>	rn00590197
<i>Myod</i>	rn01511496
<i>Ppara</i>	rn00566193
<i>P70S6K</i>	rn00583148
<i>RPLP0</i>	rn03302271
<i>Tgfb1</i>	rn00572010
<i>Tnfa</i>	dr03126850
<i>Tweak</i>	rn01461586
<i>MMP-2</i>	rn01538170

*Actb*, Beta-actina; *Akt1*, Proteína quinase 1; *Atrogin1*, Atrogina 1; *Cebpa*, fator de transcrição adipogênico; *COL1A1* e *COL1A3*, Colágeno do tipo I e Colágeno do tipo III, respectivamente; *Ctgf*, Fator de crescimento do tecido conjuntivo; *Foxo1*, Fator de transcrição de forquilha 1; *Gapdh*, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *Igf1a*, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; *Il6*, Interleucina 6; *Murf1*, E3 ubiquitina-proteína ligase TRIM63; *Myod*, Proteína 1 para determinação de mioblastos; *Ppara*, Receptores ativados por proliferadores

*peroxissomais do tipo alfa; P70S6K, Proteína ribossômica S6 quinase beta-1; ; RPLP0, proteína ribossomal P0; Tgfb1, Fator de crescimento de transformação beta 1; Tnfa, Fator de necrose tumoral alfa; Tweak, membro 12 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral; MMP-2, Metaloproteinases de matriz 2.*

## 6.8 Western Blotting

As proteínas totais foram extraídas dos tecidos usando tampão fosfato salino (PBS 1%, pH 7,4) suplementado com coquetel inibidor de protease (Roche, Alemanha) com cinco esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2,3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, Estados Unidos) e três partículas afiadas de carbeto de silício (1 mm) (BioSpec Products) por agitação em um instrumento denominado FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, Estados Unidos). Após isso, as amostras foram centrifugadas (14.000g por 30min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a concentração de proteína foi determinada usando um espectrofotômetro NanoDrop R® (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, Estados Unidos). O extrato proteico (20 mg) foi separada usando 10% SDS-PAGE e transferida para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore).

As membranas foram bloqueadas usando 5% de leite desnatado em tampão TBST [200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,5M NaCl, 0,1% Tween 20] por 2h e depois incubadas com os anticorpos monoclonais primários: COL1A1 (Sigma Aldrich , C2456), Nfkb p65 (Cell Signaling Technology, #4764) e Ppara (Santa Cruz Biotechnology, sc-9000) durante a noite a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo IgG anti-camundongo secundário - HRP (Santa Cruz Biotechnology, Sc -2005) ou anticorpo IgG anticoelho - HRP (Cell Signaling Technology, #7074) por 1h em temperatura ambiente.

A quimioluminescência foi detectada usando um kit de detecção de *Western blotting* ECL (GE Healthcare, Chicago, IL, Estados Unidos). A densitometria foi realizada usando ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A intensidade relacionada à proteína analisada foi normalizada para a banda GAPDH (A1978, Sigma Aldrich). Os géis para o ensaio foram preparados concomitantemente usando as mesmas soluções, objetivando garantir a precisão da análise. A eletroforese dos géis foi realizada



simultaneamente usando tampões frescos na mesma condição e temperatura, visando minimizar as variações entre os géis. Além disso, a normalização de proteínas, voltagem e tempo durante a eletroforese foram cuidadosamente padronizados. Também escolhemos o melhor padrão de normalização. A qualidade do anticorpo primário (monoclonal) foi confirmada, a saturação do sinal foi prevenida e a intensidade do sinal da proteína alvo foi quantificada com precisão.

### **6.9 Análise de Dados:**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foi utilizado para analisar a homogeneidade da variância. A ANOVA de dois fatores (dieta x treinamento) foi utilizada para comparar as variáveis dependentes entre os quatro grupos da prole. Quando detectada uma diferença significativa, o teste *post hoc* de Tukey foi aplicado para identificar onde as mesmas ocorreram. Um nível alfa de  $p \leq 0,05$  será considerado significativo. Adicionalmente, o GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, Califórnia) foi usado para elaboração dos gráficos e análise estatística.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análise dos efeitos da dieta hiperlipídica e do TF paterno no ganho de peso corporal e no índice de adiposidade da prole

Considerando os trabalhos já publicados anteriormente (De Sousa Neto et al., 2020; Sousa Neto et al., 2020), as proles submetidas à dieta hiperlipídica apresentaram maior peso corporal, adiposidade visceral total e área transversal de adiposidade quando comparadas com as proles submetidas à dieta controle ( $p=0,001$ ) após 6 meses de dieta, como ilustrado na Tabela 3.

O TF paterno atenuou o ganho de peso corporal (PPT-DH=  $398,8 \pm 8,1$  x PPS-DH= $433,9 \pm 34,7$ ;  $p=0,001$ ) e adiposidade visceral total (PPT-DH=  $2,63 \pm 0,68$  x PPS-DH= $4,75 \pm 0,95$ ) na prole submetida à dieta hiperlipídica.

**Tabela 3.** Trajetória do crescimento da prole.

	<b>PPS-DC</b>	<b>PPT-DC</b>	<b>PPS-DH</b>	<b>PPT-DH</b>
<b>Peso corporal</b>				
Peso corporal do nascimento (g)	29,34 ± 1,46	27,83 ± 1,66	32,64 ± 1,47	31,92 ± 1,26
Peso ao desmamar (g)	32,6 ± 1,62	30,92 ± 1,84	36,27 ± 1,64	35,4 ± 1,40
Peso corporal final (g)	331,36 ± 12,97	311,12 ± 22,81	433,9 ± 31,06 <sup>a,b</sup>	398,84 ± 7,30 <sup>a,b,c</sup>
<b>Marcadores de adiposidade</b>				
Peso da adiposidade visceral total (mg)	4,26 ± 0,94	3,39 ± 1,34	13,46 ± 2,08 <sup>a,b</sup>	6,91 ± 2,22 <sup>a,b,c</sup>
Índice de adiposidade (%)	1,29 ± 0,24	1,08 ± 0,36	4,75 ± 0,95	2,63 ± 0,68
Área transversal de adiposidade (µm <sup>2</sup> )	3699,04 ± 548,27	3256,7 ± 306,59	5891,68 ± 839,35 <sup>a,b</sup>	4473,6 ± 561,60 <sup>c</sup>
<b>Consumo alimentar</b>				
Ingestão calórica média de ração (kcal)	459,51 ± 120,27	400,89 ± 103,75	551,74 ± 50,49 <sup>a,b</sup>	546,63 ± 47,67 <sup>a,b</sup>
Ingestão calórica média de refrigerante (kcal)	20,4	20,4	20,4	20,4
Eficiência alimentar (%)	10,1%	11,10%	22,00%	19,90%
<b>Perfil metabólico</b>				
Glicose sérica (mg/dL)	92,00 ± 9,79	93,33 ± 1,77	105,75 ± 16,48 <sup>a,b</sup>	112,25 ± 11,86 <sup>a,b</sup>
Colesterol sérico (mg/dL)	156,50 ± 3,87	158,25 ± 4,79	168,40 ± 5,08 <sup>a,b</sup>	163,00 ± 1,67
Triglicerídeos séricos (mg/dL)	132,0 ± 12,28	128,8 ± 3,96	142,0 ± 11,67	138,4 ± 18,24

Os valores são representados em média ± DP. PPS-DC: prole de pais sedentários submetida à dieta controle; PPT-DC: prole de pais treinados submetida à dieta controle; PPS-DH: prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; PPT-DH: prole de pais

treinados submetida à dieta hiperlipídica. Diferenças estatísticas significativas comparadas com: <sup>a</sup>PPS-DC; <sup>b</sup>PPT-DC; <sup>c</sup>PPS-DH,  $p \leq 0,05$  (n=7 por grupo). Adaptado de Sousa Neto et al., (2018).

## 7.2 Efeitos da dieta hiperlipídica e TF paterno em proteínas estruturais da MEC, enzimas de remodelamento da matriz e níveis de RNAm dos fatores de crescimento no músculo gastrocnêmio

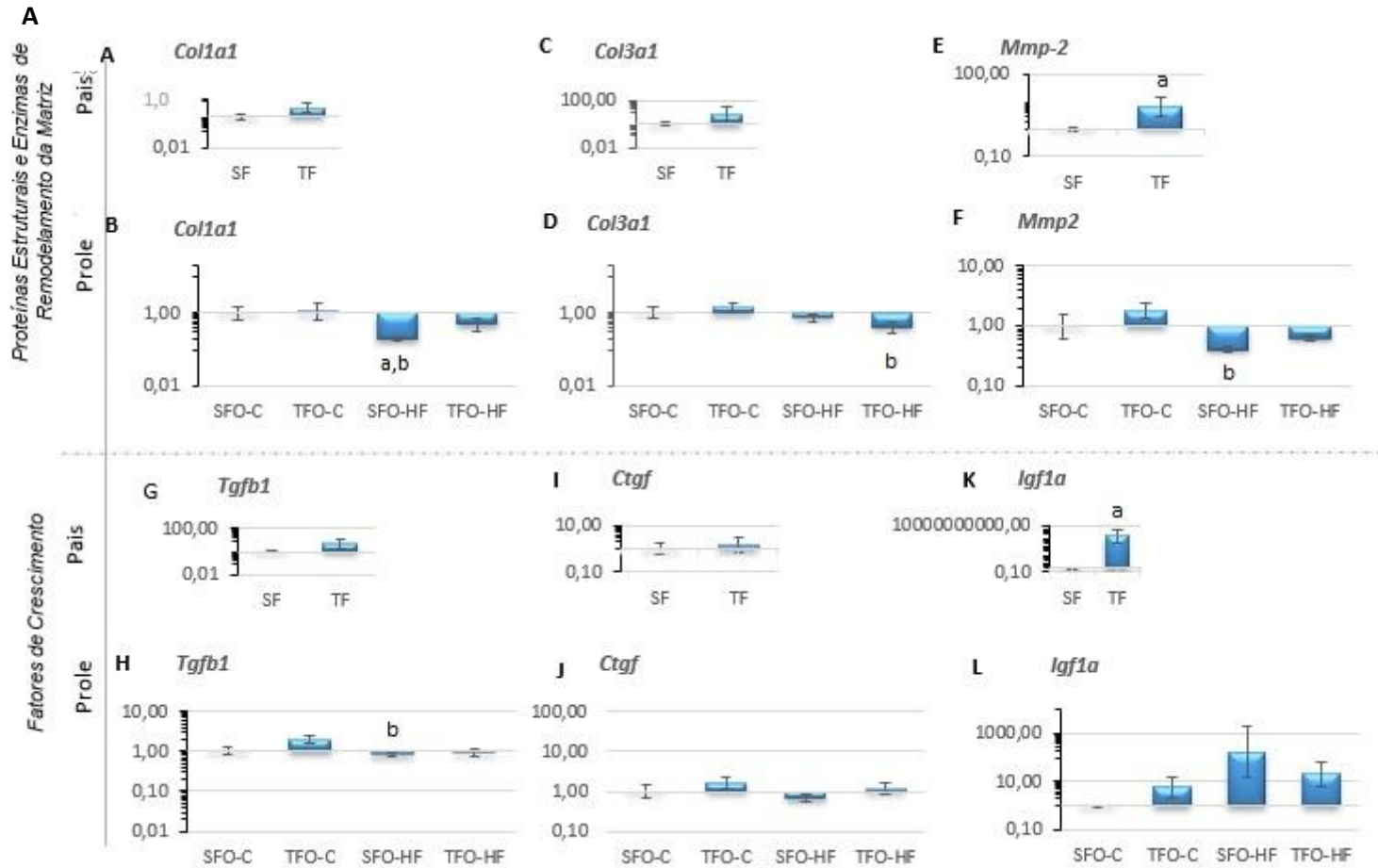
A expressão dos genes descrita abaixo foi avaliada no músculo gastrocnêmio dos animais de todos os grupos experimentais. A normalização foi realizada por meio do gene *housekeeping* RPLP0.

Não houve diferença entre os pais sedentários e treinados nos níveis de RNAm de COL1A1, COL3A1, Tgfb1, Ctgf ( $p > 0,05$ ; Figuras 2, A, C, G, I, respectivamente), ao passo que os níveis de RNAm de MMP-2 e Igf1a foram regulados positivamente nos pais treinados ( $p = 0,03$  e  $p = 0,001$ , Figuras 2, E e K, respectivamente).

No entanto, em relação ao colágeno I, a prole submetida à dieta hiperlipídica na condição paterna de sedentarismo (SFO-HFD) apresentou redução na expressão gênica em relação a prole submetida à dieta controle na condição de sedentarismo paterno (SFO-C;  $p = 0,03$ ). Em relação ao treinamento, não houve diferença significativa entre as proles de pais treinados submetidas às dietas controle e hiperlipídica (TFO-C x TFO-HFD;  $p = 0,4869$ ) (Figura 17, B).

Já em relação ao colágeno III, houve redução na expressão gênica na prole submetida à dieta hiperlipídica cujos pais treinaram, quando comparada à prole alimentada com dieta controle tendo os pais na mesma condição de treino (TFO-HFD;  $p = 0,0474$  x TFO-C) (Figura 17, D). Considerando a dieta, não houve diferença significativa na expressão gênica dos grupos submetidos às dietas controle (SFO-C) x hiperlipídica (SFO-HFD;  $p = 0,9175$ ).

Entretanto, o TF paterno não modulou a MMP-2. Além disso, nem a dieta hiperlipídica, nem o treinamento paterno modificaram a expressão do Tgfb1 em relação à prole (todas as comparações entre os grupos apresentaram  $p > 0,05$ ) (Figura 17, F e H, respectivamente). Com relação a expressão do Ctgf no gastrocnêmio, também não houve diferença na prole (Figura 17, J) ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17.** Proteínas da matriz estrutural, enzimas de remodelamento da matriz e fator de crescimento. Níveis de RNAm no músculo gastrocnêmio de pais e filhos submetidos às dietas controle hiperlipídica. Os dados utilizam o erro padrão da média geométrica. O

$2^{\Delta\Delta CT}$  representa o nível de expressão. **(A, B)** Colágeno, tipo I, alfa 1 (*Col1a1*). **(C,D)** Colágeno, tipo III, alfa 3 (*Col3a1*). **(E, F)** Metaloproteinase de matriz 2 (*Mmp2*). **(G,H)** Fator de transformação de crescimento beta 1 (*Tgfb1*). **(I, J)** Fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Ctgf*). **(K, L)** Fator de crescimento 1 alfa do tipo pró-insulina (*Igf1a*). PS, pais sedentários; TF, pais treinados; SFO-C, prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TFO-C, prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HFD, prole de pais sedentários submetida a dieta hiperlipídica; TFO-HFD, prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Diferenças estatisticamente significativas em relação a: <sup>a</sup>SFO-C; <sup>b</sup>TFO-C; p=0,05 (n= 7 por grupo).

### **7.3 Efeitos da dieta hiperlipídica e TF paterno nos níveis de RNAm das vias de síntese e atrofia do músculo gastrocnêmio**

Os níveis de expressão gênica relacionados aos genes Akt1, MyoD, P70S6K e Murf1 do músculo gastrocnêmio estavam aumentados após o TF paterno ( $p=0,01$ ; Figura 18, A, C, E, K, respectivamente).

Apesar da diferença apresentada no gráfico referente a Akt (SFO-HFD x TFO-C;  $p=0,01$ ; Figura 18, B), não houve diferença estatisticamente significativa.

Além disso, também não foram observadas alterações na expressão gênica dos pais para os níveis de RNAm de Foxo1 (SF x TF;  $p>0,05$ ; Figura 18, G) e Atrogin1 (SF x TF;  $p>0,05$ ; Figura 18, I, respectivamente).

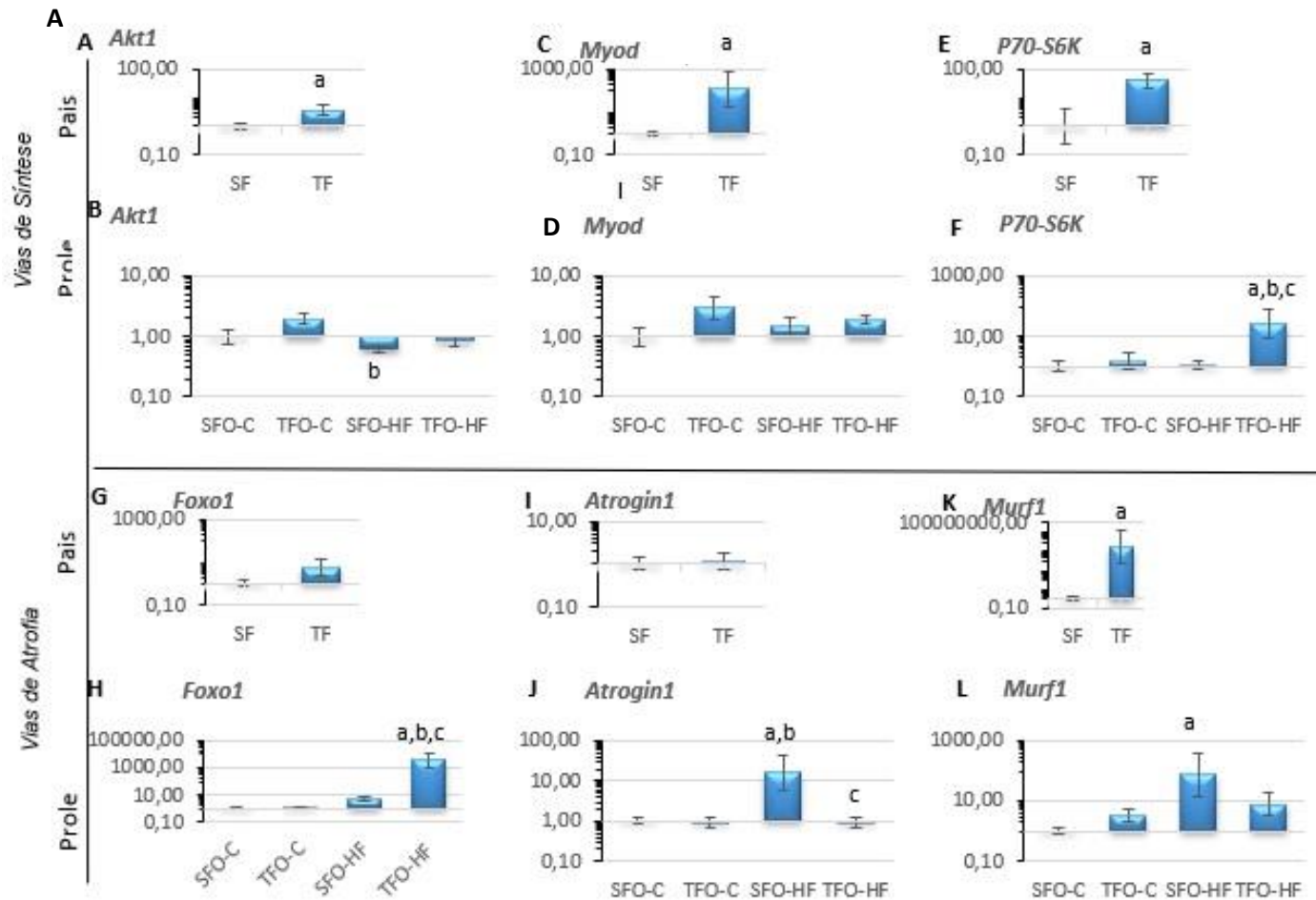
Em relação à prole, os níveis de expressão de Atrogin1 e Murf1 foram significativamente regulados positivamente com a dieta hiperlipídica (SFO-HFD x SFO-C;  $p=0,008$  e  $p=0,01$ ; Figura 18, J e L).

Quanto ao TF paterno, houve aumento na expressão gênica de RNAm de P70S6K e Foxo1 no grupo PPT-DH quando comparado ao grupo PPS-DH ( $p=0,03$  e  $p=0,001$ ; Figura 18, F, H, respectivamente).

Ademais, o TF paterno amenizou o aumento associado à dieta hiperlipídica nos níveis de expressão dos genes Atrogin1 na prole (PPT-DH x PPS-DH;  $p=0,007$ ; Figura 18, J).

Não foram observadas alterações nos níveis de RNAm de MyoD entre os grupos da prole ( $p>0,05$ ; Figura 18, D).





**Figura 18.** Níveis de RNAm das vias de síntese e atrofia no músculo esquelético dos pais e da prole submetida às dietas controle e hiperlipídica. Os dados estão expressos em média geométrica  $\pm$  erro padrão. Os níveis de expressão são representados por  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . **(A, B)** Proteína quinase B (*Akt1*). **(C, D)** Proteína determinante de mioblastos 1 (*Myod*). **(E, F)** Proteína ribossomal S6 quinase beta

1 (P70S6K). **(G, H)** Fator de transcrição de Forquilha 01 (Foxo1). **(I, J)** Atrogina 1 (Atrogin1). **(K, L)** ubiquitina proteína ligase E3 – 1 (Murf1). SF: Pais sedentários; TF: Pais treinados; SFO-C: Prole de pais sedentários submetida à dieta controle; SFO-DH: Prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-C: Prole de pais treinados submetida à dieta controle; TFO-HF: Prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Diferenças estatisticamente significativas comparado a: <sup>a</sup>SFO-C; <sup>b</sup>TFO-C; <sup>c</sup>SFO-HF.  $p \leq 0.05$  (n= 7 por grupo).

#### **7.4 Efeitos da dieta hiperlipídica e TF paterno nas vias inflamatórias, fatores de transcrição adipogênicos e fatores de transcrição reguladores dos níveis de RNAm do metabolismo lipídico no músculo gastrocnêmio**

Não foram observadas alterações nos níveis de RNAm da via inflamatória dos pais ( $p > 0,05$ ; Figura 19, A, C, E, G).

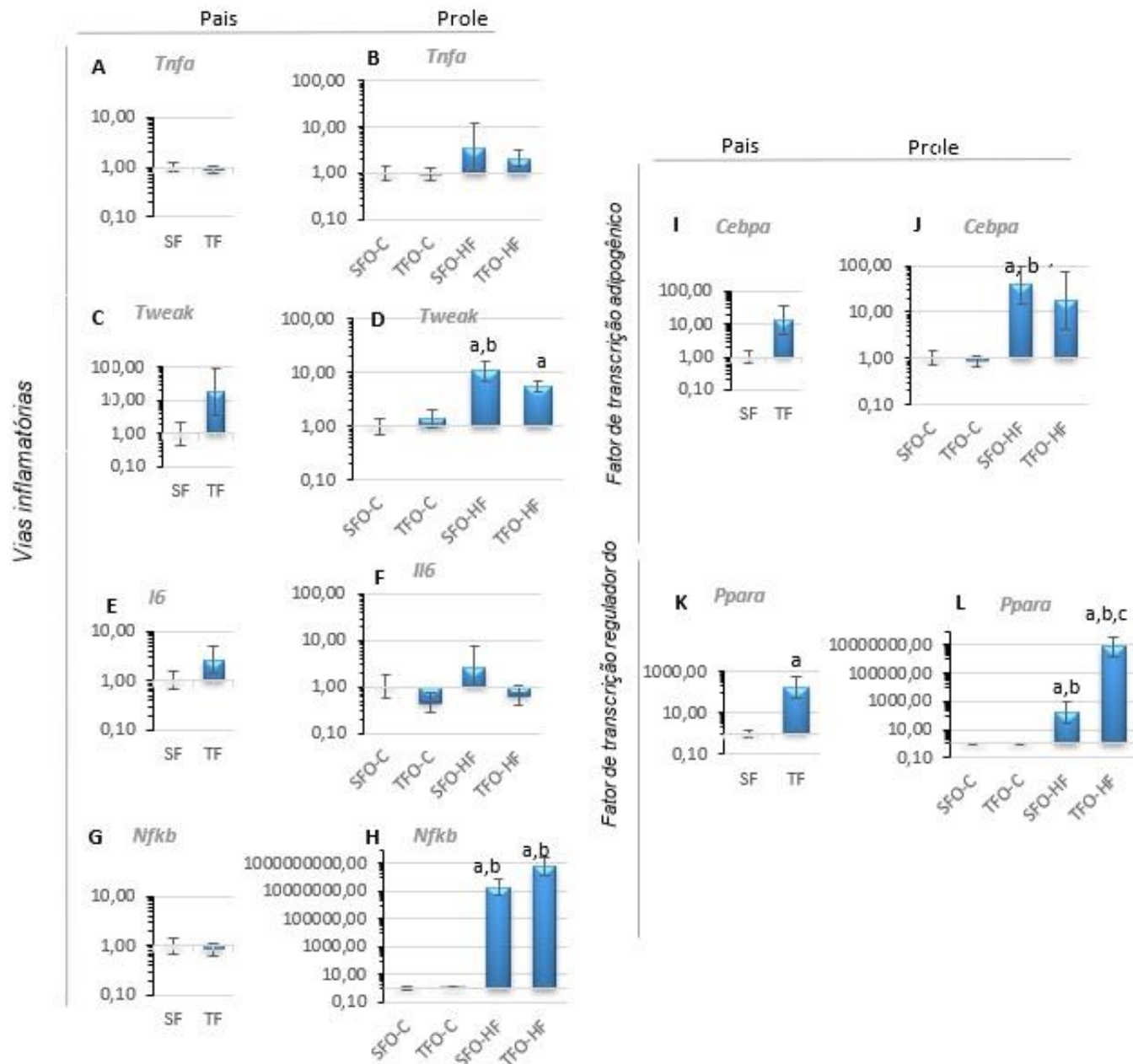
Os níveis de RNAm de Cebpa e Ppara aumentaram nos pais treinados quando comparados aos pais sedentários ( $p=0,04$  e  $p=0,01$ , respectivamente; Figura 19, I e K).

Em relação à prole, não foram observadas alterações nos níveis de RNAm de Tnfa ( $p > 0,05$ ; Figura 19, B).

Os níveis de RNAm dos genes Tweak, Cebpa e Nfkb foram regulados positivamente com a dieta hiperlipídica (SFO-HFD x SFO-C;  $p=0,01$ ; Figura 19, D, J, H, respectivamente).

Considerando o TF paterno, este aumentou os níveis de RNAm de Ppara no grupo TFO-HFD quando comparado ao grupo SFO-HFD ( $p= 0,0001$ , Figura 19, L).

Ademais, não foram observadas alterações nos níveis de RNAm de Il6 entre os grupos da prole ( $p > 0,05$ ; Figura 19, F).



**Figura 19.** Vias inflamatórias, fator de transcrição adipogênico e fator de transcrição regulador dos níveis de RNAm do metabolismo lipídico no gastrocnêmio de pais e proles, submetidas às dietas controle e hiperlipídica (**A**, **B**). Fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*). (**C**, **D**) Membro 12 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral (*Tweak*). (**E**, **F**) Interleucina-6 (*Il6*). (**G**, **H**) Fator nuclear kappa B (*Nfkb*). (**I**, **J**) CCAAT/proteína de ligação ao intensificador (*Cebpa*). (**K**, **L**) Receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*Ppara*). SF: Pais sedentários; TF: Pais treinados; SF-C: Prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TF-O: Prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HFD: Prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HFD: Prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Os dados são o erro padrão da média geométrica. O nível de expressão é representado pelo  $2^{\Delta\Delta CT}$ . SF, pais sedentários; TF, pais treinados; SFO-C, prole de pais sedentários submetida à

dieta controle; TFO-C, prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HFD, prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HFD, prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica. Diferenças estatisticamente significativas em relação a: <sup>a</sup>SFO-C; <sup>b</sup>TFO-C; <sup>c</sup>SFO-HFD,  $p < 0,05$  (n= 7 por grupo).

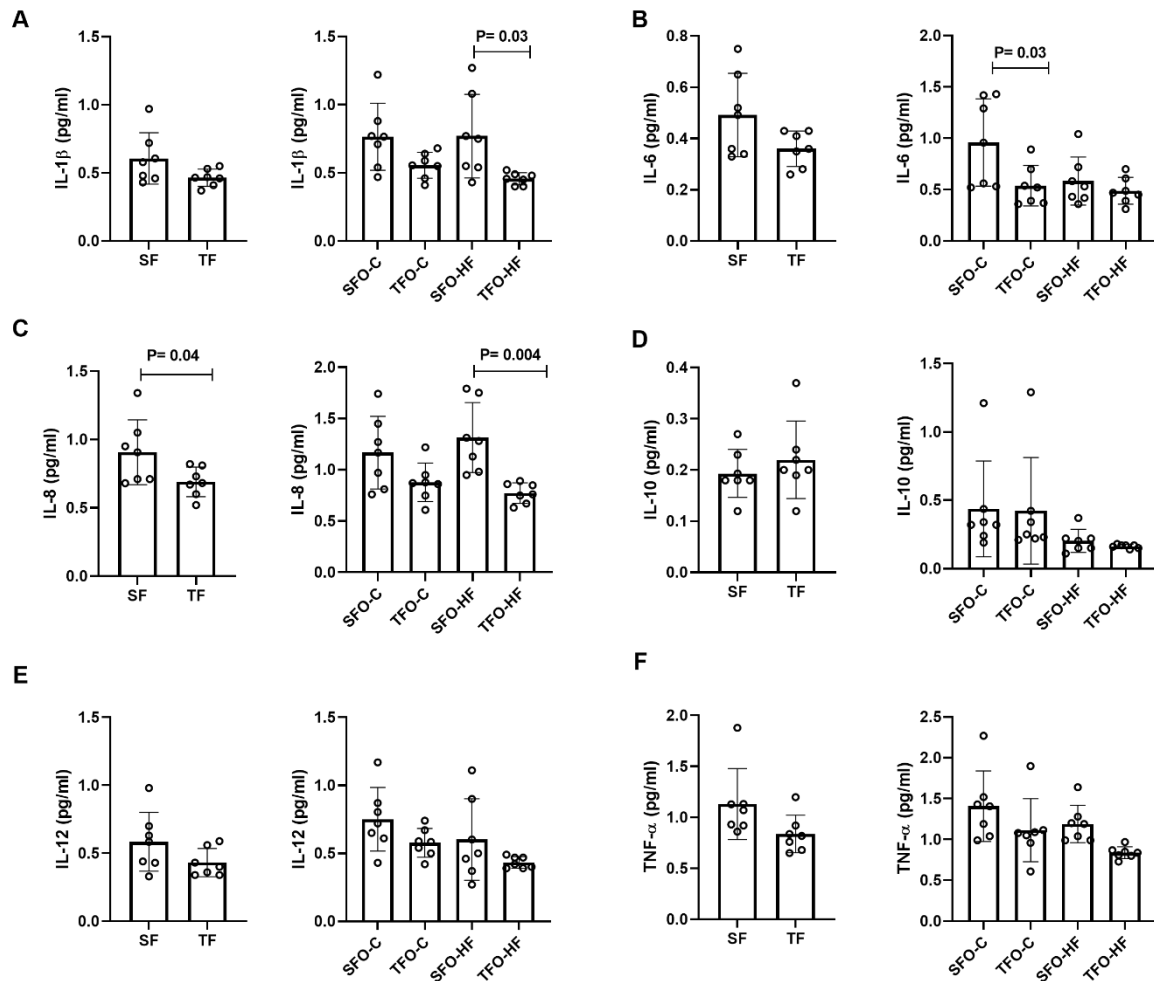
## **7.5 Efeitos da dieta hiperlipídica e do TF paterno nas citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no músculo gastrocnêmio**

Observou-se que a dieta hiperlipídica não modulou os níveis de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no músculo gastrocnêmio da prole submetida à dieta hiperlipídica ( $p > 0,05$ ; Figura 20).

O TF paterno diminuiu os níveis de Il1b na prole submetida à dieta hiperlipídica (TFO-HFD x SFO-C;  $p = 0,03$ ; Figura 20, A). Além disso, o TF paterno também diminuiu os níveis de Il6 no grupo PPT-DC quando comparado ao grupo SFO-C ( $p = 0,03$ ; Figura 20, B).

Ainda, destaca-se que os níveis de Il8 foram modificados de forma semelhante nos pais e na prole, evidenciando a diminuição nos grupos que treinaram (TF x SF;  $p = 0,04$  e TFO-HFD x SFO-HFD;  $p = 0,004$ , Figura 20, C).

Ademais, não foram observadas alterações nos níveis proteicos de IL-10, IL-12 e Tnfa entre os grupos da prole ( $p > 0,05$ ; Figura 20, D, E e F).



**Figura 20.** Níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio de pais e proles submetidos às dietas controle e hiperlipídica. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **(A, B)** Interleucina-1b (IL-1b). **(C, D)** Interleucina-6 (IL-6). **(E, F)** Interleucina-8 (IL-8). **(G, H)** Interleucina-10 (IL-10). **(I, J)** Interleucina-12 (IL-12). **(K, L)** Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). SF, pais sedentários; TF, pais treinados; SFO-C, prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TFO-C, prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HF, prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HF, prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n= 7 por grupo).

## 7.6 Efeitos da dieta hiperlipídica e TF paterno na atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio

Nos pais, os níveis das MMP-2 pró e atividade da MMP-2 ativa aumentou no músculo gastrocnêmio em resposta ao TF (PT x PS;  $p=0,001$  e  $p=0,002$ , respectivamente, Figura 21, A e C).

Considerando a atividade proteolítica, houve detecção referente a MMP-2 nas proles. O tipo de dieta não modificou a atividade das isoformas pró ( $p=0,5637$ ) e nem ativa ( $p=0,7061$ ) da MMP-2 nos grupos sedentários (PPS-DC x PPS-DH) (Figura 21, B e D).

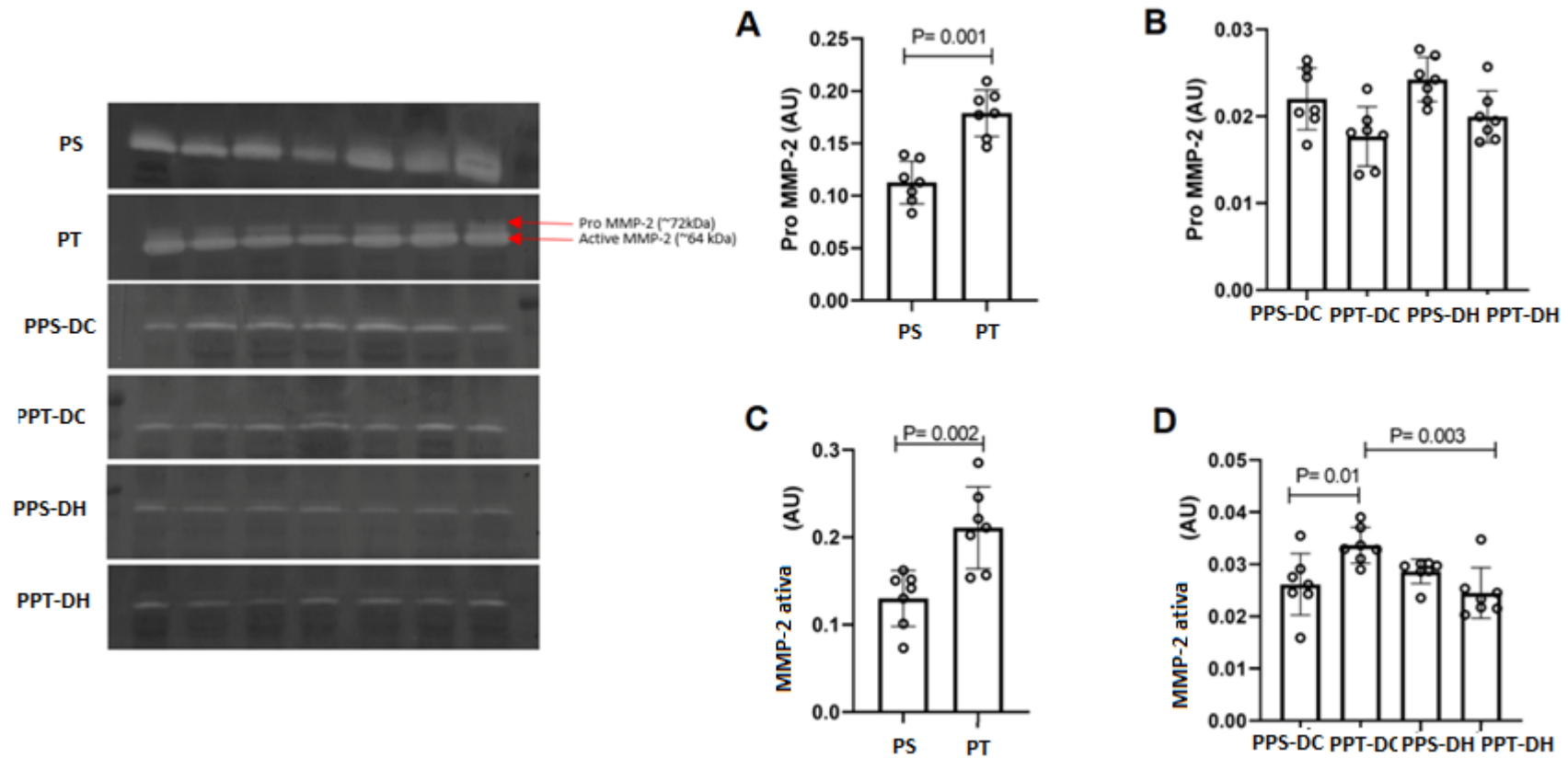
Em relação aos grupos PPT-DC e PPT-DH, houve aumento na atividade da isoforma pró ( $p=0,0037$ ), no entanto, não houve diferença significativa na isoforma ativa da MMP-2 ( $p=0,01648$ ) (Figura 21, B e D).

Em relação ao treinamento de força, este não modificou a atividade da isoforma pró ( $p=0,0750$ ), mas aumentou a atividade da isoforma ativa ( $p=0,0174$ ) na exposição à dieta controle (PPS-DC x PPT-DC) (Figura 21, B e D), sugerindo que o TF paterno apresenta um efeito protetivo na prole submetida à dieta controle.

Considerando os filhos de pais sedentários alimentados com dieta controle e filhos de pais treinados alimentados com dieta hiperlipídica (PPS-DC x PPT-DH), foi evidenciado que não houve alteração na atividade das isoformas pró ( $p=0,6180$ ) e ativa da MMP-2 ( $p=0,8926$ ) (Figura 21, B e D), indicando que treino e dieta hiperlipídica associados não alteram a atividade das isoformas.

A atividade da MMP-9 não foi detectada através da Zimografia.





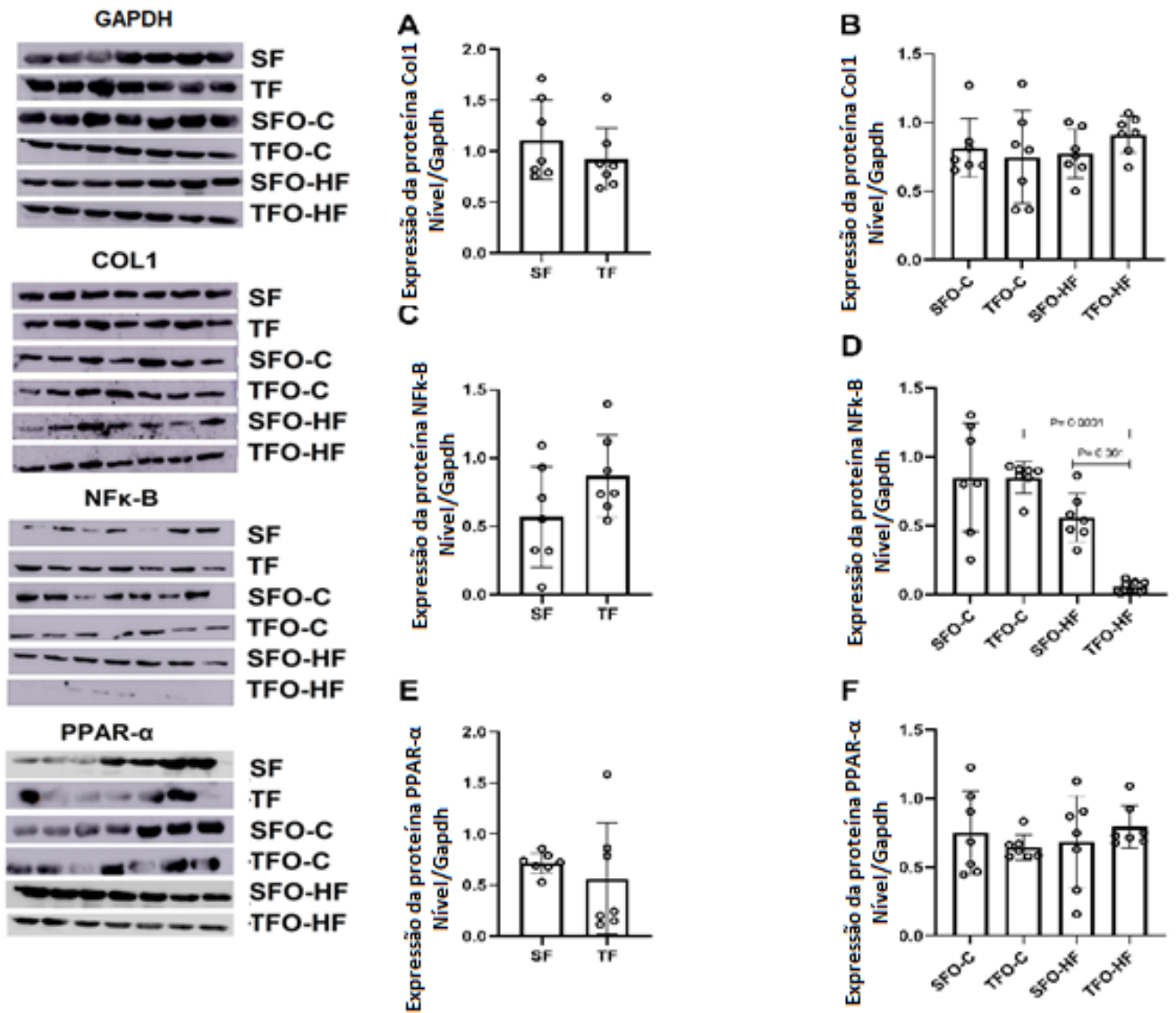
**Figura 21.** Efeitos das dietas controle e hiperlipídica nas proles de pais treinados e sedentários sobre a atividade das bandas pró (latente) e ativa da MMP-2 no gastrocnêmio. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. PPS-DC = prole de pais sedentários submetida à dieta controle; PPT-DC = prole de pais treinados exposta à dieta controle; PPS-DH = prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; PPT-DH = prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n= 7 por grupo). Diferença significativa comparado: <sup>a</sup>:PPT-DC x PPS-DC; <sup>b</sup>:PPT-DH x PPT-DC,  $p < 0.05$ .

### **7.7 Efeitos da dieta hiperlipídica e TF paterno nos níveis proteicos de Col1, Nfkb e Ppara no músculo gastrocnêmio**

Não houve diferença estatística entre pais sedentários e treinados nos níveis proteicos de Col1, Nfkb e Ppara no músculo gastrocnêmio ( $p > 0,05$ ; Figura 22, A, C e E).

Além disso, não houve modulação nos níveis proteicos de Col1, Nfkb e Ppara na prole de pais sedentários (SFO-HFD x SFO-C,  $p > 0,05$ ; Figura 22, B, D e F).

De forma curiosa, o grupo TFO-C apresentou níveis elevados de Nfkb quando comparado ao grupo TFO-HFD ( $p=0,0001$ ; Figura 22, D). Todavia, o TF paterno diminuiu os níveis proteicos de Nfkb na prole submetida à dieta hiperlipídica (TFO-HFD x SFO-HFD;  $p= 0,01$ ; Figura 22, D).



**Figura 22.** Níveis de expressão do Colágeno tipo I, Nfkb e Ppara no músculo gastrocnêmio dos pais e das proles submetidas às dietas controle e hiperlipídica. Os dados são expressos em média  $\pm$  DP. **(A)** Níveis de expressão do Col1/Gapdh nos pais. **(B)** Níveis de expressão proteica de Col1/Gapdh na prole. **(C)** Níveis de expressão proteica de Nfkb/Gapdh nos pais. **(D)** Níveis de expressão proteica de Nfkb/Gapdh na prole. **(E)** Níveis de expressão proteica de Ppara nos pais. **(F)** Níveis de expressão proteica de Ppara na prole. SF, Pais sedentários; TF, Pais treinados; SFO-C, Prole de pais sedentários submetida à dieta controle; TFO-C, Prole de pais treinados submetida à dieta controle; SFO-HFD, Prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica; TFO-HFD, Prole de pais treinados submetida à dieta hiperlipídica (n = 7 por grupo).

## 8. DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado com o objetivo de explorar a função do TF paterno realizado antes do acasalamento e fecundação em proteínas envolvidas no remodelamento do músculo esquelético da prole submetida às dietas controle (ração padrão) e hiperlipídica.

Nossos resultados suportam a hipótese inicial, demonstrando que a dieta hiperlipídica promove alterações nos níveis de RNAm de colágeno, ao passo que regula positivamente as vias inflamatórias e de atrofia, assim como os níveis de RNAm do fator de transcrição adipogênico no músculo gastrocnêmio da prole. Anteriormente, foi hipotetizado que esses achados, quando simultâneos, poderiam contribuir para comprometer a integridade funcional do músculo. Também demonstramos que o TF paterno aumentou a atividade da MMP-2 na prole submetida à dieta controle, com diminuição dos níveis de Il6. De forma mais expressiva, o TF paterno aumentou os níveis de RNAm de P70S6K e Ppara, além de diminuir os níveis de RNAm de Atrogin1 e os níveis proteicos de Nfkb, Il1b e Il8 na prole submetida à dieta hiperlipídica. Esses dados suportam que o TF paterno é capaz de modular as principais vias de remodelamento do músculo esquelético e perfis inflamatórios nos descendentes submetidos a ambos os tipos de dieta, o que pode ter grande importância para a função celular, longevidade e manutenção da homeostase muscular. Nossas descobertas pontuam informações importantíssimas acerca dos mecanismos moleculares que participam dos impactos intergeracionais do TF paterno no sistema musculoesquelético da prole. Dessa forma, essa abordagem molecular avança o conhecimento atual acerca da biologia muscular.

Sabe-se que o músculo esquelético é um órgão altamente plástico com função fundamental na manutenção física e na saúde metabólica (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013). Portanto, estratégias direcionadas ao aumento de qualidade desse tecido são indispensáveis, e o TF paterno é considerado uma ferramenta não farmacológica muito eficaz na promoção dos impactos positivos no durante o remodelamento. Todavia, as adaptações moleculares que fazem a mediação das adaptações musculares são complexas (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013). Considerando os efeitos do TF na expressão

de genes e proteínas envolvidas na inflamação e remodelamento muscular paternos, a análise molecular realizada comparando os grupos PT x PS reforça a hipótese de que o TF é capaz de modular diversas vias envolvidas no remodelamento muscular esquelético. Nossos achados revelaram que o TF paterno aumentou os marcadores anabólicos (Igf1, Akt, P70SK6 e MyoD), além de Murf1, Cebpa, níveis de RNAm de Ppara e atividade de MMP-2 no músculo gastrocnêmio, simultaneamente à diminuição nos níveis de Il8, sugerindo que o TF induz adaptações moleculares através de sinais integrados. Ademais, uma complexa interação entre diversas vias de sinalização conectadas a vários fatores de transcrição e tradução realiza a mediação da adaptabilidade muscular (KARALAKI et al., 2009). Levando em consideração os efeitos pleiotrópicos (conjunto de múltiplos efeitos de um gene, frequente quando um único gene controla várias características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas) do TF e a complexidade das respostas no nível molecular, nosso estudo sugere que não existe apenas uma única via mediando a adaptação ao exercício físico. Dessa forma, é necessário ressaltar que a homeostase celular é atingida através de um delicado equilíbrio entre as múltiplas vias necessárias para a realização dos complexos processos fisiológicos.

No que tange os efeitos da dieta hiperlipídica na expressão de genes e proteínas envolvidos na inflamação muscular e remodelamento no músculo esquelético da prole, já é bem descrito na literatura que a ingestão de dieta rica em gordura com concomitante ingestão calórica desequilibrada são fatores de risco conhecidos responsáveis por afetar negativamente a função do músculo esquelético (HERRENBRUCK; BOLLINGER, 2020; LEE et al., 2015). As alterações nocivas encontram-se relacionadas ao aumento de lipídios intramiocelulares, associados à lipotoxicidade (aumento nos níveis lipídicos que compromete a função, envolvida na patogênese da síndrome metabólica), remodelamento disfuncional da MEC e modificações nos genes relacionados à atrofia muscular (ABRIGO et al., 2016). Efetivamente, a dieta hiperlipídica desregula os níveis de RNAm de colágeno, ao passo que regula positivamente as vias inflamatórias (Tweak e Nfkb) e atroficas (Atrogin1 e Murf1), bem como os níveis de RNAm de Cebpa no músculo gastrocnêmio da prole (PPS-DH x PPS-DC). Kumar et al, (2012) suportam esses achados, ao demonstrarem que o eixo Tweak-Nfkb pode estar envolvido na quebra de proteínas e na regulação dos

genes *Murf1* e *Atrogin1*. Tais alterações podem culminar em um fenótipo inflamatório e catabólico ligado ao processo integrado da adipogênese, o que resulta em um cenário de remodelamento desfavorável. Curiosamente, descobrimos que as alterações na expressão gênica não foram manifestadas ao nível proteico durante o tempo analisado, possivelmente em função do atraso na síntese do RNAm ou da proteína durante a transição de estado, além das proteínas desconectadas dos transcritos (LIU; BEYER; AEBERSOLD, 2016). Segundo registros já prévios na literatura, compreende-se que os níveis de proteínas são regulados por reguladores da transcrição, tais como potenciadores (sequência de DNA que estimula a iniciação da transcrição, atuando à distância do gene) e mecanismos pós-transcricionais (conjunto de modificações nos três tipos principais de RNA, com o objetivo de gerar a forma funcional do RNA em questão para que se torne apto a executar as suas funções) (SADHALE; VERMA; NAOREM, 2007). Ademais, o sistema ubiquitina-proteassoma frequentemente controla a renovação de proteínas. Não devemos descartar a possibilidade de o *Nfkb* estar associado à superexpressão do sistema ubiquitina-proteassoma através da dieta hiperlipídica (Abrigo et al., 2016), podendo ter comprometido os padrões e a função proteica do presente estudo.

Também encontramos que a dieta hiperlipídica apresenta efeitos adversos importantes no remodelamento do músculo esquelético em virtude da regulação negativa dos níveis de RNAm de *COL3A1* e a atividade de *MMP-2*, simultaneamente à regulação positiva dos níveis de RNAm de *Nfkb* e *Foxo1* na prole de pais treinados (PPT-DH x PPT-DC). Esses achados são característicos de um fenótipo degenerativo, atrófico e com fraqueza muscular. O remodelamento muscular anormal também pode comprometer a atividade celular, a polaridade do tecido e o reparo muscular, provocando o início ou a progressão da doença crônica. Considerando os mecanismos relacionados, Abrigo et al., (2016) esclareceram que a dieta hiperlipídica diminui as células estromais mesenquimais multipotentes (células-tronco/progenitoras pós-natal de grande relevância, especialmente pela capacidade de secretar inúmeras moléculas com propriedades antiapoptóticas, imunorregulatórias e angiogênicas), e isso ocorre através de um complexo *crosstalk* de inflamação, estresse oxidativo, disfunções nas células satélites e apoptose de células musculares. Esse *crosstalk*, então, estimula um efeito atrófico no músculo

esquelético. Deve-se considerar que o processo relacionado à adipogênese também induz à inflamação e atrofia das células musculares na condição de obesidade (PELLEGRINELLI, V. et al; 2015), justificando o aumento nos níveis de RNAm de Cebpa, Tweak e Nfkb, Atrogin1 e Murf1 simultaneamente no grupo da prole de pais sedentários submetida à dieta hiperlipídica (PPS-DH).

Acerca dos efeitos do TF paterno sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na inflamação muscular e remodelamento na prole submetida à dieta controle, um resultado impressionante obtido nesse estudo diz respeito ao aumento da atividade da MMP-2 de forma simultânea à diminuição dos níveis de Il6. Isso sugere que o estilo de vida paterno pode modificar o remodelamento da MEC e do perfil inflamatório quando a prole é submetida a uma dieta balanceada. O aumento da MMP-2 induz o remodelamento das fibras e do tecido conjuntivo na homeostase fisiológica (XIAOPING; YONG, 2009b). A MMP-2 desempenha função determinante na diferenciação, reparo muscular e regeneração, participando dos processos de morfogênese e angiogênese (DE SOUSA NETO et al., 2017; MARTINEZ-HUENCHULLAN et al., 2017). Em um estudo realizado por Hojman et al., (2019), foi observado que qualquer alteração da MEC dá início a mudanças conformacionais da membrana indispensáveis para as vesículas intrafibrilares contendo o Il6 serem liberadas. Dessa forma, é plausível conjecturar que o remodelamento muscular adequado modula o ajuste da inflamação, indispensáveis para a adaptação muscular. Estudos adicionais devem ser realizados objetivando testar a hipótese descrita e elucidar a conexão de causalidade entre esses dois fenômenos biológicos. O estudo de Sousa Neto et al., (2020) evidenciou que o TF paterno induziu alterações em nível proteico no ventrículo esquerdo da prole eutrófica. Todavia, essas alterações foram mais proeminentes no tendão da prole submetida à dieta hiperlipídica de Sousa Neto et al., (2020). Logo, essas evidências suportam a ideia de que as respostas moleculares na prole podem sofrer alterações de acordo com o tecido considerado.

O presente estudo corroborou os resultados de Lira et al. (2009), que demonstraram o potencial efeito do exercício na regulação negativa dos níveis de Il6 no músculo esquelético de camundongos saudáveis. Considerando o provável significado fisiológico, a diminuição da produção de Il6 proveniente do músculo esquelético pode inibir os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, além

de auxiliar a manutenção da homeostase de glicose e do metabolismo lipídico (LIRA et al., 2009; MUÑOZ-CÁNOVES et al., 2013). Logo, pressupõe-se que o TF paterno pode levar a uma diminuição do risco de incidências de várias doenças ligadas ao sedentarismo da prole, além da atenuação da inflamação crônica associada à dieta hiperlipídica, já que mesmo em estado eutrófico (PPT-DC x PPS-DC) surge um efeito antiinflamatório considerável.

Outra descoberta realizada pelo nosso estudo está relacionada aos efeitos do TF paterno na expressão de genes e proteínas envolvidos na inflamação muscular e remodelamento da prole submetida à dieta hiperlipídica. Foi observado que o exercício regulou positivamente o P70S6K, eficaz em reduzir o aumento dos níveis de RNAm de Atrogin1 (associado à dieta hiperlipídica) na prole submetida à dieta hiperlipídica, podendo inibir a degradação proteica e promover a síntese. Supostamente, tais adaptações são essenciais para amenizar os danos musculoesqueléticos, a região inflamatória e a apoptose nuclear (ABRIGO et al., 2016). Sendo assim, deve-se considerar o TF paterno como um importante aliado para o combate da atrofia muscular esquelética associada à dieta hiperlipídica.

De acordo com os achados de Krout et al., (2018) e Stanford et al., (2018), o protocolo que utilizou a roda voluntária de curto (3 semanas) e longo prazos (12 semanas) demonstrou ser eficaz na supressão dos efeitos de uma dieta hiperlipídica consumida pelo pai na prole, revertendo o comprometimento da intolerância à glicose, massa gorda e captação de glicose no músculo esquelético. Essa proteção ocorreu no músculo esquelético da prole através do aumento da expressão das vias de sinalização da insulina (GLUT4, IRS1 e PI3K) (KROUT et al., 2018). No entanto, os efeitos da hipertrofia muscular podem ser limitados, porque a corrida voluntária de roda provavelmente apresenta um componente aeróbio maior quando comparada à subida de escada com peso (KUROSAKA et al., 2009; LEGERLOTZ et al., 2008). Um meio alternativo de promover uma sobrecarga de força com benefícios das propriedades musculoesqueléticas e da função neuromuscular é proporcionado pelo ato de subir escada, havendo ativação da via de sinalização que controla a hipertrofia do músculo esquelético (HORNBERGER; FARRAR, 2004). Ponderamos que é necessário dar atenção especial ao atual protocolo de TF (8 semanas, 3 vezes por semana), pois pode contribuir significativamente na prevenção e tratamento



da perda de massa muscular em doenças metabólicas e neuromusculares de descendentes submetidos aos fatores de risco.

Surpreendentemente, percebemos o aumento do Foxo1 nos níveis de RNAm na prole submetida à dieta hiperlipídica após o TF paterno. Apesar de Foxo1 ter acentuado a ativação da atrofia muscular, essa proteína também é capaz de apresentar funções pleiotrópicas (quando um único gene controla diversas características do fenótipo, que muitas vezes não estão relacionadas) (SANCHEZ; CANDAU; BERNARDI, 2014; SEILER et al., 2013). Esse achado corrobora estudos que previamente demonstraram a modulação da localização subcelular da translocase de ácido graxo de membrana por meio de Foxo1, capaz de permitir a captação de ácido graxo das células musculares (BASTIE et al., 2005; KAMEI et al., 2003). Há indícios de que Foxo1 pode servir como um “interruptor”, que altera o substrato de combustão, ao invés de glicose para lipídios, nas condições de dieta hiperlipídica (CONSTANTIN-TEODOSIU et al., 2012; SANCHEZ; CANDAU; BERNARDI, 2014). Além do mais, na condição de suprerexpressão do Foxo1, o Ppara pode colaborar para mudanças adaptativas no metabolismo de ácidos graxos (CONSTANTIN-TEODOSIU et al., 2012), suportando nossos resultados obtidos no grupo PPT-DH. O conjunto dos nossos resultados sugere que o TF paterno é capaz de combinar fatores que podem contribuir para a oxidação da gordura muscular na prole.

Outro fator de proteção contra os efeitos indesejados da dieta hiperlipídica é o aumento nos níveis de RNAm de Ppara proporcionado pelo TF paterno, associado à diminuição dos níveis proteicos de Nfkb e Il8 na prole submetida à dieta hiperlipídica. Quando o Ppara é regulado positivamente, os níveis de triglicerídeos diminuem e a lipólise aumenta, contribuindo para a atividade inflamatória e melhorias metabólicas (GROSS et al., 2017; WANG et al., 2020). Além disso, o Ppara interage com diversas moléculas (REDDY et al., 2010). Sabe-se que o Ppara inibe a via Nfkb e reduz os marcadores inflamatórios, tais como Il1b e Il8, conseqüentemente, suprimindo o processo de atrofia em diferentes níveis (RIGAMONTI; CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2008). Recentemente, um corpo de estudos revelou que essas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na homeostase do cálcio, mitogênese, inibição da angiogênese, quimiotaxia, degranulação de neutrófilos e ativação de leucócitos, o que pode colaborar de forma imprescindível para o mecanismo inflamatório

(CHUANG; KHORRAM, 2014; KOFANOVA et al., 2019; PERNHORST et al., 2013). Ponderando nossos achados, o TF paterno é capaz de minimizar o armazenamento de lipídios no músculo esquelético e de modular o estado inflamatório através dos níveis de Il1b e Il8. Esse resultado corrobora a diminuição dos níveis de RNAm de Atrogin1 observada no grupo PPT-DH, tendo em vista que Il1b e Il8 também desempenham função crucial na sinalização da atrofia muscular esquelética (CALLAWAY et al., 2019).

As vias de sinalização canônicas que propiciam a ativação de Nfkb direcionam-se para o complexo Ikb quinase (IKK). Esse complexo é incumbido da fosforilação de Ikb e é indispensável para a translocação consecutiva do Nfkb ativo do citoplasma para o núcleo (LAWRENCE, 2009). Ademais, múltiplas vias de sinalização são ativadas pela estimulação do receptor *Toll like (TLR)* e pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), ambos inerentes à dieta hiperlipídica. Nesse contexto, estão inclusos o eixo kb/Nfkb, a sinalização JNK/AP-1 e MAP quinases (ERK1/2, JNK e p38), responsáveis por promover a expressão seguinte de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2016). O TF diminui a expressão do TLR, ao passo que diminui a expressão de enzimas antioxidantes e sirtuína 1 (SIRT1), responsável pela inibição de Nfkb por meio da desacetilação e indução da ativação da via de sinalização Ppara (GLEESON; MCFARLIN; FLYNN, 2006; LIU; CHANG, 2018). Por conseguinte, o grupo dessas vias moleculares e o *crosstalk* mútuo podem elucidar os possíveis efeitos protetores do TF paterno na inflamação do músculo esquelético da prole no presente estudo.

Os níveis de proteínas da matriz estrutural ou níveis de RNAm da enzima de remodelamento da matriz não foram modulados através do TF paterno, tais como o nível da proteína Col1 e a atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio da prole que foi submetida à dieta hiperlipídica. Esse fato pode estar relacionado aos níveis semelhantes do RNAm de Ctgf e Tgfb entre os grupos PPT-DH e PPS-DH. Em condições de resistência à insulina, a MEC muscular esquelética sofre perturbações (GRAAE et al., 2019; KANG et al., 2011). Entretanto, evidenciamos que o TF paterno não diminuiu a área sob a curva (AUC) durante o teste oral de tolerância à glicose (Sousa Neto et al., 2020), o que pode ter colaborado para limitar os efeitos do TF paterno nas adaptações da MEC em condições de dieta hiperlipídica.

Stanford et al., (2018) demonstraram que o exercício paterno em idosos ( $p > 100$ ) suprime os efeitos da dieta hiperlipídica na prole, revertendo o comprometimento observado na tolerância à glicose, porcentagem de massa gorda e captação de glicose em diferentes músculos esqueléticos da prole. No presente estudo, mostramos que ratos adultos (4 meses de idade) modificam a expressão gênica e proteica no músculo esquelético da prole, propondo que a idade diferente dos pais pode modular a fisiologia muscular da prole.

As próximas pesquisas devem abarcar espécies diferentes de animais e sexo feminino da prole, além de também investigar os efeitos do destreinamento paterno. Outra instigante hipótese a ser considerada para as futuras investigações inclui o TF ao longo da vida e não apenas restrito a um tempo de intervenção estipulado ou à idade paterna. Uma aplicação prática essencial desse estudo é promover o incentivo dos pais para a realização de exercícios regulares no decorrer da vida, já que isso pode retardar o aumento dos riscos deletérios propagados pelas gerações.

A implantação do TF paterno pode se tornar a principal ferramenta no combate do crescente número de distúrbios musculoesqueléticos que atualmente perturbam a saúde funcional e o bem-estar das gerações futuras. Pistas cruciais podem ser fornecidas para a saúde pública e prática clínica através de uma visão mecanicista da herança epigenética. Por conseguinte, a tendência ou prevalência de desequilíbrios musculares na prole pode ser em partes explicada pelo ambiente e estilo de vida do pai.

## 9. CONCLUSÃO

Sucintamente, o estilo de vida do pai e a dieta da prole modularam de formas diferentes os genes-chave e a expressão de proteínas envolvidas nas vias de inflamação e remodelamento muscular. A dieta hiperlipídica é responsável por ativar fatores inflamatórios, que podem induzir a desregulação das vias de sinalização associadas à estrutura da MEC e ao equilíbrio entre síntese/desagregação muscular. Curiosamente, o TF paterno é um fator crítico capaz de reprogramar diferentes vias de remodelamento independentemente da dieta da prole. Nesse contexto, MMP-2 e Il6 para a prole submetida à dieta controle, e as vias de síntese/atrofia, eixo Ppara e Nfkb/citocinas para as proles submetidas à dieta hiperlipídica, são candidatos relevantes modulados pelo TF paterno que podem tornam-se potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de distúrbios do músculo esquelético. Essas moléculas críticas podem contribuir para um fenótipo muscular saudável nos descendentes. Acreditamos que nossas descobertas forneçam um avanço significativo que colabora com o mapeamento das principais vias reguladas pelo exercício paterno no músculo esquelético da prole.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações decorrentes da dieta hiperlipídica alteram a homeostase da matriz e, conseqüentemente, o remodelamento do músculo esquelético. O perfil inflamatório resultante dessa dieta causa alterações na síntese proteica, precedendo alterações funcionais intramusculares.

## **11. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os mecanismos que envolvem o treinamento de força paterno e seus efeitos protetivos manifestados a nível molecular no remodelamento do músculo esquelético da prole necessitam de mais estudos, a fim de elucidar outros mecanismos pelos quais há efeito protetivo na primeira geração, mesmo quando esta for submetida a dietas hiperlipídicas.

## 12. IMPACTOS PRÁTICOS DOS ACHADOS PARA A SOCIEDADE

A pesquisa desenvolvida no nível de Mestrado abordou a epigenética, investigando os efeitos do treinamento de força paterno no período que antecedeu a fecundação com fêmeas sedentárias, tendo em vista que há muitos estudos relacionados ao impacto dos hábitos e da saúde materna nos filhos, mas, ainda, pouco se sabe sobre o impacto dos hábitos paternos na primeira geração de filhos (F1).

Considerando que os estudos existentes na literatura investigaram os efeitos metabólicos na F1, assim como outros autores utilizaram o treinamento aeróbio em seus protocolos, decidimos realizar o treinamento de força nos pais e a análise do músculo esquelético (gastrocnêmio) da prole submetida à dieta hiperlipídica. Nesse contexto, observamos que o treinamento de força paterno realizado antes da fecundação exerce efeito protetivo em alguns aspectos no músculo esquelético da F1. Curiosamente, os dados do presente estudo significam que quando o pai realiza um treinamento de força antes da fecundação, através de modificações no ambiente químico celular, ocorrem efeitos protetivos nos músculos esqueléticos dos filhos.

Esse efeito é importantíssimo, pois podemos sugerir que a prática constante do treinamento de força pelo pai pode diminuir os gastos públicos no futuro ao proteger o músculo esquelético da prole em condições relacionadas ao consumo de dieta rica em gordura. O exercício físico, portanto é uma estratégia de baixo custo e não farmacológica capaz de promover a saúde de homens e mulheres que o praticam, além de transmitir benefícios à geração futura. Um maior incentivo à prática do exercício físico, especialmente masculina – público alvo relacionado aos óbitos mais precoces quando comparado às mulheres (DOBSON, 2006) – , acarretará gerações mais saudáveis com menores índices de adoecimento e, conseqüentemente, menos tempo de afastamento do trabalho por motivo de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas aos hábitos de vida ruins.

De forma geral, observamos a ligação entre a prática do exercício físico, com ênfase no treinamento de força, e o potencial impacto positivo na economia a médio e longo prazos.

### **13. ATIVIDADES/PRODUTOS DESENVOLVIDAS(OS) DURANTE O MESTRADO**

Além dos critérios obrigatórios para desenvolvimento e conclusão do mestrado (cumprimento de créditos obrigatórios e optativos, desenvolvimento e conclusão do projeto de pesquisa, realização da capacitação em Docência/bolsa do PPGCR, submissão de um artigo e comparecimento em eventos nacionais e internacionais), durante o período vigente também foram desenvolvidas outras atividades mencionadas a seguir. Segundo a **Resolução do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação Nº 001/2021/PPGCR**, que regulamenta os critérios para a defesa pública de mestrado dos discentes regularmente matriculados, são pré-requisitos:

**1. Ter sido aprovado no exame de projeto de mestrado:**

Código: 320684. Disciplina: Exame de Qualificação. Menção: AP.

**2. Ter integralizado todos os créditos do curso:**

Créditos obrigatórios: 22.

Créditos obtidos: 31.

Dessas disciplinas, duas foram no regime de Aluna Especial, sendo cumpridas à distância nas seguintes universidades:

UNICAMP – Universidade de Campinas (Tópicos Especiais em Biologia Celular e Estrutural I, 3 créditos, 2021);

Total da Carga Horária Semanal (Pós-Graduação): 3h semanais.

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo (Biologia Celular e Molecular). 2º Semestre, 4 créditos, 60 horas, 100% de presença, conceito A, 2021).

**3. Estar dentro do prazo máximo estabelecido para a defesa da dissertação de mestrado, estipulado no Regulamento Interno do PPGCR.**

Solicitação de prorrogação realizada e confirmada via e-mail com a Secretaria de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, em virtude

da interrupção das atividades ocasionada pela pandemia de COVID-19, com medidas restritivas em 2020, que interromperam as atividades no laboratório

**4. Apresentar manuscrito/artigo, em tema relacionado à dissertação, com o comprovante da publicação, ou do aceite, ou da submissão em periódico indexado, com percentil maior de 50% nas bases de dados Web of Science ou SCOPUS, a que for maior:**

Segue a forma de citação do artigo previamente submetido e aceito, como ilustrado no anexo 1.

Salomão R, Neto IVS, Ramos GV, Tibana RA, Durigan JQ, Pereira GB, Franco OL, Royer C, Neves FAR, de Carvalho ACA, Nóbrega OT, Haddad R, Prestes J, Marqueti RC. Paternal Resistance Exercise Modulates Skeletal Muscle Remodeling Pathways in Fathers and Male Offspring Submitted to a High-Fat Diet. *Front Physiol.* 2021 Sep 27;12:706128. doi: 10.3389/fphys.2021.706128. PMID: 34646148; PMCID: PMC8503191.

**5. Apresentar um resumo publicado em anais de eventos nacionais e/ou internacionais relacionado a temática da sua dissertação:**

**Evento:** Reapresentação do I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas. **Resumo apresentado:** TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO E AS ADAPTAÇÕES MOLECULARES DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO NA PROLE SUBMETIDA À DIETA HIPERLIPÍDICA. ISBN: 978-65-00-01799-1. 2020;

**Evento:** Reapresentação do I Congresso Brasileiro de Biologia Molecular. **Resumo apresentado:** EFEITOS DO TREINAMENTO DE FORÇA PATERNO NA EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA ÀS VIAS INFLAMATÓRIAS E FATORES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DA PROLE SUBMETIDA À DIETA HIPERLIPÍDICA".

**Evento:** 1º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular. **Resumo apresentado:** PATERNAL RESISTENCE TRAINING AND



MOLECULAR ADAPTATIONS OF THE GASTROCNEMIUM MUSCLE IN OFFSPRING SUBMITTED TO HIGH-FAT DIET. 2021).

**6. Apresentar um produto com impacto econômico, social ou cultural:**

Descrito anteriormente, no item 11.

**7. Presença em um evento internacional:**

II CONGRESSO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE.

Período: 28 de março a 01 abril de 2022. Evento na modalidade online.

Participação: ouvinte.

Além da participações em outros projetos e comissões:

1. Participação do projeto do Professor Thiago Rosa – Universidade Católica de Brasília, envolvendo análise de MMPs circulantes em pacientes renais crônicos através da realização da técnica de Zimografia;
2. Participação do projeto colaboração com INCOR, envolvendo a análise de MMPs em válvulas cardíacas, através da realização da técnica de Zimografia;
3. Participação no projeto de pesquisa denominado *Efeitos do Pós-COVID-19 na ativação neural e arquitetura da unidade Musculotendínea do quadríceps e sua correlação com marcadores inflamatórios* (2021-2022);
4. Membro da comissão organizadora do I Simpósio Interdisciplinar em Ciências da Reabilitação (2021);
5. Publicação do artigo previamente submetido e ilustrado na Figura 23 (Paternal Resistance Exercise Modulates Skeletal Muscle Remodeling Pathways in Fathers and Male Offspring Submitted to a High-Fat Diet, publicado em 27 de setembro de 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.706128);
6. Representação discente do Conselho Pleno (2021-2022);

7. Apresentação de resumos em eventos nacionais (já mencionados anteriormente) .
8. Monitora da disciplina de Seminários Avançados; Prof. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Marqueti Durigan, 2021.

## REFERÊNCIAS

ABRIGO, J. et al. High Fat Diet-Induced Skeletal Muscle Wasting Is Decreased by Mesenchymal Stem Cells Administration: Implications on Oxidative Stress, Ubiquitin Proteasome Pathway Activation, and Myonuclear Apoptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, 2016.

ADAMS, G. R. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 782–790, 2006.

ADDITIONAL, G.-K. The Importance of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development and Function. **Intech**, [s. l.], p. 13, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J><https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics><http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>>

ALKHEDAIDE, A. et al. Chronic effects of soft drink consumption on the health state of Wistar rats: A biochemical, genetic and histopathological study. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 5109–5117, 2016.

ALLEN, D. L. et al. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1900–1908, 2001.

BACQUER, O. Le et al. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 117, n. 2, 2007.

BALDWIN, K. M. et al. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 4, n. October, 2013.

BARRÈS, R. et al. Non-CpG Methylation of the PGC-1 $\alpha$  Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 189–198, 2009.

BARRÈS, R. et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 405–411, 2012.

BASTIE, C. C. et al. FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 14, p. 14222–14229, 2005.

BAUD, V.; KARIN, M. Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Scandinavian Journal of Public Health**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 25–29, 1978.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 411, n. 11–12, p. 785–

793, 2010.

BENITO, P. J. et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of resistance training on whole-body muscle growth in healthy adult males. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 1–27, 2020.

BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1645–1687, 2013.

BLACKWELL, T. K.; WALKER, A. K. Transcription mechanisms. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, [s. l.], p. 1–16, 2006.

BLOCH, R. J. et al. Costameres: Repeating structures at the sarcolemma of skeletal muscle. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, [s. l.], n. 403 SUPPL., 2002.

BODEN-ALBALA, B.; SOUTHWICK, L.; CARMAN, H. Dietary Interventions to Lower the Risk of Stroke. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2015.

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**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001.

BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 307, n. 6, p. E469–E484, 2014.

BRAKEBUSCH, C. et al. Integrins in invasive growth. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 109, n. 8, p. 999–1006, 2002.

BROWN, L. A. et al. Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 215, n. 1, p. 46–57, 2015.

BRUCE, C. R.; DYCK, D. J. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: Effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 287, n. 4 50-4, p. 616–621, 2004.

BURKLY, L. C.; MICHAELSON, J. S.; ZHENG, T. S. TWEAK/Fn14 pathway: An immunological switch for shaping tissue responses. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 244, n. 1, p. 99–114, 2011.

CALLAWAY, C. S. et al. IL-8 released from human pancreatic cancer and tumor-associated stromal cells signals through a CXCR2-ERK1/2 axis to induce muscle atrophy. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1–20, 2019.

CAREY, A. L.; FEBBRAIO, M. A. Interleukin-6 and insulin sensitivity: Friend or foe? **Diabetologia**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 1135–1142, 2004.

CARLSEN, H. et al. Diet-induced obesity increases NF- $\kappa$ B signaling in reporter mice. **Genes and Nutrition**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 215–222, 2009.

CARMELI, E. et al. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 191–197, 2004.

CARMELI, E. et al. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 613–619, 2005.

CARSON, J. A.; WEI, L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 377, 2005.

CASTORENA, C. M. Effects of a brief high-fat diet and acute exercise on the mTORC1 and IKK/NF- $\kappa$ B pathways in rat skeletal muscle. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 251–262, 2016.

CENCETTI, F. et al. TGF $\beta$ 1 evokes myoblast apoptotic response via a novel signaling pathway involving S1P4 transactivation upstream of Rho-kinase-2 activation. **FASEB Journal**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 4532–4546, 2013.

CESARI, M. et al. Sarcopenia, obesity, and inflammation - Results from the Trial of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors study. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 428–434, 2005.

CHAILLOU, T.; KIRBY, T. J.; MCCARTHY, J. J. Ribosome Biogenesis: Emerging Evidence for a Central Role in the Regulation of Skeletal Muscle Mass. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 229, n. 11, p. 1584–1594, 2014.

CHAKRAVARTHY, M. V. et al. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 46, p. 35942–35952, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005832200>>

CHAMPROUX, A. et al. A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: Paternal epigenetic and transgenerational inheritance. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 6, n. MAY, 2018.

CHIQUET, M. et al. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? **Matrix Biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 73–80, 2003.

CHRIST-ROBERTS, C. Y. et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1233–1242, 2004.

CHUANG, T. Der; KHORRAM, O. miR-200c Regulates IL8 expression by targeting IKBKB: A potential mediator of inflammation in leiomyoma

pathogenesis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.

CLARK, I. M. et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 40, n. 6–7, p. 1362–1378, 2008.

CLARKE, B. A. et al. The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 376–385, 2007.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. Art:10.2165/00007256-200737090-00001. [s. l.], v. 37, n. 9, p. 737–763, 2007.

CONSTANTIN-TEODOSIU, D. et al. The role of FOXO and PPAR transcription factors in diet-mediated inhibition of PDC activation and carbohydrate oxidation during exercise in humans and the role of pharmacological activation of PDC in overriding these changes. **Diabetes**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 1017–1024, 2012.

CORNELISON, D. D. W.; WOLD, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 191, n. 2, p. 270–283, 1997.

CRAMER, P. Organization and regulation of gene transcription. **Nature**, [s. l.], v. 573, n. 7772, p. 45–54, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>>

DE SOUSA NETO, I. V. et al. Effects of Resistance Training Volume on MMPs in Circulation, Muscle and Adipose Tissue. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 307–313, 2017.

DE SOUSA NETO, I. V. et al. Paternal Resistance Training Induced Modifications in the Left Ventricle Proteome Independent of Offspring Diet. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2020, 2020.

DE SOUSA NETO, I. V. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles and blood circulation during aging. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, n. MAR, p. 1–9, 2018.

DELANEY, K. et al. The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biology International**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 706–715, 2017.

DELLA GATTA, P. A. et al. Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 39, p. 80–86, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.006>>

DEMASI, M.; LAURINDO, F. R. M. Physiological and pathological role of the ubiquitinproteasome system in the vascular smooth muscle cell. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 183–193, 2012.

DENHAM, J. Exercise and epigenetic inheritance of disease risk. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 222, n. 1, 2018.

DOBSON, R. Men are more likely than women to die early. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 333, n. 7561, p. 220, 2006.

DOCHERTY, S. et al. The effect of exercise on cytokines: implications for musculoskeletal health: a narrative review. **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13102-022-00397-2>>

DUNN, S. E.; BURNS, J. L.; MICHEL, R. N. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 31, p. 21908–21912, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.31.21908>>

DUNN, S. E.; CHIN, E. R.; MICHEL, R. N. Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 151, n. 3, p. 663–672, 2000.

EBERT, S. M. et al. Skeletal muscle atrophy: Discovery of mechanisms and potential therapies. **Physiology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 232–239, 2019.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>>

FEOLI, A. M. et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 789–793, 2003.

FERNANDES, T.; PAULA, U.; SOCI, R. Determinantes Do Músculo Esquelético Mediados Pelo Treinamento Físico : Estudo De Vias De Sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 169–188, 2008.

FISCHER, C. P.; PHILIP. Interleukin-6 in acute exercise and training : what is the biological relevance. **Exercise Immunology Review**, [s. l.], v. 1991, n. May, p. 6–33, 2016.

FRANCHI, M. V.; REEVES, N. D.; NARICI, M. V. Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: Morphological, molecular, and metabolic adaptations. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.

GENTIAN LLURI AND DIANE M. JAWORSKI. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, [s. l.], v. 10 (2), n. 1, p. 116–125, 2009.

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

GLASS, D. J. Signaling pathways perturbing muscle mass. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 225–229, 2010.

GLASS, D.; ROUBENOFF, R. Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1211,

p. 25–36, 2010.

GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and toll-like receptors. **Exercise Immunology Review**, [s. l.], v. 12, p. 34–53, 2006.

GLOVER, E. I.; PHILLIPS, S. M. Resistance exercise and appropriate nutrition to counteract muscle wasting and promote muscle hypertrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 630–634, 2010.

GOLDSPINK, G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. **Physiology**, [s. l.], n. 4, p. 232–238, 2005.

GOODMAN, C. A. et al. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 589, n. 22, p. 5485–5501, 2011.

GRAAE, A. S. et al. ADAMTS9 regulates skeletal muscle insulin sensitivity through extracellular matrix alterations. **Diabetes**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 502–514, 2019.

GROSS, B. et al. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 36–49, 2017.

GUEDES, J. M. et al. Muscular resistance, hypertrophy and strength training equally reduce adiposity, inflammation and insulin resistance in mice with diet-induced obesity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, [s. l.], v. 18, p. eAO4784, 2020.

GUZZONI, V. et al. Effect of resistance training on extracellular matrix adaptations in skeletal muscle of older rats. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

HAMEED, M. et al. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 555, n. 1, p. 231–240, 2004.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 $\alpha$  in inflammation and chronic disease. **Nature**, [s. l.], v. 454, n. 7203, p. 463–469, 2008.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 377, 2005.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, [s. l.], v. 159, n. 4, p. 738–749, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.029>>

HERAS, G. et al. Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) functions and cellular localization are regulated by SUMO1 post-translational modification. **Journal of Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 356–370, 2019.

HERRENBRUCK, A. R.; BOLLINGER, L. M. Role of skeletal muscle autophagy in high-fat-diet-induced obesity and exercise. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 56–64, 2020.



HILL, M.; GOLDSPINK, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 549, n. 2, p. 409–418, 2003.

HINITIS, Y. et al. Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 102–112, 2011.

HOJMAN, P. et al. IL-6 release from muscles during exercise is stimulated by lactate-dependent protease activity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, [s. l.], v. 316, n. 5, p. E940–E947, 2019.

HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 831–838, 2016.

HOLZ, M. K. et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 569–580, 2005.

HOPPELER, H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 219, n. 2, p. 205–213, 2016.

HORNBERGER, T. A. et al. Selenoprotein-deficient transgenic mice exhibit enhanced exercise-induced muscle growth. **Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 133, n. 10, p. 3091–3097, 2003.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004.

IDE, B. N.; LAZARIM, F. L.; MACEDO, D. V. De. Hipertrofia muscular esquelética humana induzida pelo exercício físico/Exercise-induced human skeletal muscle hypertrophy. **Revista Ciências Em Saúde**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 52, 2011. Disponível em: <[http://200.216.240.50:8484/rcsfmit/ojs-2.3.3-3/index.php/rcsfmit\\_zero/article/view/40](http://200.216.240.50:8484/rcsfmit/ojs-2.3.3-3/index.php/rcsfmit_zero/article/view/40)>

ISHIDO, M.; KAMI, K.; MASUHARA, M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s. l.], v. 180, n. 3, p. 281–289, 2004.

JACINTO, E.; HALL, M. N. TOR signalling in bugs, brain and brawn. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 117–126, 2003.

JÄER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 29, p. 12017–12022, 2007.

JAISWAL, N. et al. The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 28, n. August,

p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.08.001>>

KAHN, B. B. et al. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 15–25, 2005.

KAMEI, Y. et al. A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 536, n. 1–3, p. 232–236, 2003.

KANG, L. et al. Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin  $\alpha 2\beta 1$  in mice. **Diabetes**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 416–426, 2011.

KARALAKI, M. et al. Muscle regeneration: Cellular and molecular events. **In Vivo**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 779–796, 2009.

KASSAR-DUCHOSSOY, L. et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. **Nature**, [s. l.], v. 431, n. 7007, p. 466–471, 2004.

KELLER, C. et al. Differential regulation of IL-6 and TNF- $\alpha$  via calcineurin in human skeletal muscle cells. **Cytokine**, [s. l.], v. 36, n. 3–4, p. 141–147, 2006.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 649–665, 2013.

KJÆR, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 649–698, 2004.

KOFANOVA, O. et al. IL8 and EDEM3 gene expression ratio indicates peripheral blood mononuclear cell (PBMC) quality. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 465, n. November 2018, p. 13–19, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.11.012>>

KOLEVA, M. et al. Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 16, p. 1863–1870, 2005.

KOSKINEN, S. O. et al. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 444, n. 1–2, p. 59–72, 2002.

KOSKINEN, S. O. A. et al. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 9–15, 2001. a.

KOSKINEN, S. O. A. et al. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 280, n. 5 49-5, p. 1292–1300, 2001. b.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KRAMER, H. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 388–395, 2007.

KROUT, D. et al. Paternal exercise protects mouse offspring from high-fat-diet-induced type 2 diabetes risk by increasing skeletal muscle insulin signaling. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 57, p. 35–44, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.013>>

KUBICA, N. et al. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B $\epsilon$  mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 9, p. 7570–7580, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413732200>>

KUMAR, A.; BHATNAGAR, S.; PAUL, P. K. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 233–239, 2012.

KUROSAKA, M. et al. Effects of voluntary wheel running on satellite cells in the rat plantaris muscle. **Journal of Sports Science and Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 51–57, 2009.

LAMBERT, E. et al. TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 187–198, 2004.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, J. H.; JUN, H. S. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, n. JAN, 2019.

LEE, S. R. et al. Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. **Aging Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 403–411, 2015.

LEGERLOTZ, K. et al. Voluntary resistance running wheel activity pattern and skeletal muscle growth in rats. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 754–762, 2008.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 6, n. 5, 2014.

LI, M. O. et al. Transforming Growth Factor-B Regulation of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 99–146, 2006.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1 $\alpha$ : A key regulator of energy metabolism. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 145–151, 2006.

LIPINA, C. et al. Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 584, n. 11, p. 2403–2408, 2010.

LIRA, F. S. et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 458–461, 2009.

LIU, H. W.; CHANG, S. J. Moderate exercise suppresses NF- $\kappa$ B signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1 $\alpha$  axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–9, 2018.

LIU, J. et al. Depressed mitochondrial biogenesis and dynamic remodeling in mouse tibialis anterior and gastrocnemius induced by 4-week hindlimb unloading. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 901–910, 2012.

LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**, [s. l.], v. 165, n. 3, p. 535–550, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>>

LOCHMANN, T. L. et al. Epigenetic modifications of the PGC-1 $\alpha$  promoter during exercise induced expression in mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

LOKIREDDY, S. et al. Identification of atrogin-1-targeted proteins $\theta\delta$  during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 303, n. 5, p. 512–529, 2012.

LOPEZ, P. et al. Resistance Training Load Effects on Muscle Hypertrophy and Strength Gain: Systematic Review and Network Meta-analysis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1206–1216, 2021.

LOUIS, E. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 1744–1751, 2007.

LUCOTTI, P. et al. Aerobic and resistance training effects compared to aerobic training alone in obese type 2 diabetic patients on diet treatment. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 395–403, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.08.002>>

MAJORCZYK, M.; SMOLAŁG, D. Effect of physical activity on IGF-1 and IGFBP levels in the context of civilization diseases prevention. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 105–111, 2016.

MANUSCRIPT, A. Resistance in Mice. [s. l.], v. 57, n. 3, p. 603–613, 2014.

MARINHOPRIVIERO, F. B. Functional and Morphological Evaluation of the Mesenteric Artery, Kidney and Liver from Obese Rats: Impact of a High Fat Diet plus Fructose. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, [s. l.], v. 02, n. s1, 2014.

MARQUETI, R. D. C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal

muscle. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 559–563, 2008.

MARTINEZ-HUENCHULLAN, S. et al. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. **Obesity Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 776–790, 2017.

MASCHER, H. et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 294, n. 1, p. 43–51, 2008.

MCLEAN, C. S. et al. Gene and microRNA expression responses to exercise; relationship with insulin sensitivity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1–14, 2015.

MCLOUGHLIN, T. J. et al. FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 297, n. 3, 2009.

MCPHERSON, N. O. et al. Paternal Obesity, Interventions, and Mechanistic Pathways to Impaired Health in Offspring. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 64, n. 3–4, p. 231–238, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/365026>>

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding RNAs: Insights into functions. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 155–159, 2009.

MERLY, F. et al. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 724–732, 1999.

MICHELS, G.; HOPPE, U. C. Rapid actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 182–198, 2008.

MOSS, F. P.; LEBLOND, C. P. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 421–435, 1971.

MUÑOZ-CÁNOVES, P. et al. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? **FEBS Journal**, [s. l.], v. 280, n. 17, p. 4131–4148, 2013.

MURASHOV, A. K. et al. Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. **FASEB Journal**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 775–784, 2016.

MYLLYLÄ, R. et al. Collagen metabolism of mouse skeletal muscle during the repair of exercise injuries. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 407, n. 1, p. 64–70, 1986.

NADER, G. A.; MCLOUGHLIN, T. J.; ESSER, K. A. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: Increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 289, n. 6 58-6, p. 1457–1465, 2005.

NGUYEN, M. H.; CHENG, M.; KOH, T. J. Impaired muscle regeneration in Ob/ob and Db/db mice. **TheScientificWorldJournal**, [s. l.], v. 11, p. 1525–1535, 2011.

NIELSEN, S. et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 588, n. 20, p. 4029–4037, 2010.

NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Insulin resistance associated to obesity: The link TNF- $\alpha$ . **Archives of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 183–194, 2008.

NIU, H. et al. Matrix metalloproteinase 12 modulates high-fat-diet induced glomerular fibrogenesis and inflammation in a mouse model of obesity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. January, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep20171>>

OHSAWA, I. et al. Amount of daily exercise is an essential stimulation to alter the epigenome of skeletal muscle in rats. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 1097–1104, 2018.

OLIVER, W. T. et al. The local expression and abundance of Insulin-Like Growth Factor (IGF) binding proteins in skeletal muscle are regulated by age and gender but not local IGF-I in Vivo. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 12, p. 5455–5462, 2005.

PALLAFACCHINA, G. et al. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 14, p. 9213–9218, 2002.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 2008.

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 265–271, 2007.

PELLEGRINELLI, V.; ROUAULT, C.; RODRIGUEZ-CUENCA, S. .; ALBERT, V. E.-V.; F.; VIDAL-PUIG, A.; CLÉMENT, K.; BUTLER-BROWNE, G. S.; AND LACASA, D. Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity. [s. l.], p. 2–29, 2015.

PELLIZZON, M. et al. Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. **Obesity Research**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 947–955, 2002.

PENG, X. ding et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. **Genes and Development**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 1352–1365, 2003.

PERNHORST, K. et al. TLR4, ATF-3 and IL8 inflammation mediator expression

correlates with seizure frequency in human epileptic brain tissue. **Seizure**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 675–678, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2013.04.023>>

PEVIANI, S. M. et al. Regulation of extracellular matrix elements and sarcomerogenesis in response to different periods of passive stretching in the soleus muscle of rats /631/80 /631/337 /14 /14/32 /38 /38/77 /82 /82/29 article. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

PINCU, Y. et al. The effects of high fat diet and moderate exercise on TGF $\beta$ 1 and collagen deposition in mouse skeletal muscle. **Cytokine**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 23–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.013>>

PRESTES, J. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 700–706, 2009.

PUFE, T. et al. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 439, n. 4, p. 579–585, 2001.

REDDY, J. K. et al. Coactivators in PPAR-regulated gene expression. **PPAR Research**, [s. l.], v. 2010, 2010.

REES, S. G. et al. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 350, n. 1, p. 181–188, 2000.

REYNOLDS IV, T. H.; BODINE, S. C.; LAWRENCE, J. C. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 20, p. 17657–17662, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201142200>>

RIBEIRO, M. B. T. et al. Resistance training regulates gene expression of molecules associated with intramyocellular lipids, glucose signaling and fiber size in old rats. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

RIGAMONTI, E.; CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Regulation of macrophage functions by PPAR-  $\alpha$ , PPAR-  $\gamma$ , and LXRs in mice and men. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1050–1059, 2008.

RIVAS, D. A.; YASPELKIS, B.B.; HAWLEY, J.A.; AND LESSARD, S. J. Lipid-induced mTOR activation in rat skeletal muscle reversed by exercise and 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2018.

ROBERTS, C. K.; HEVENER, A. L.; BARNARD, R. J. Metabolic syndrome and insulin resistance: Underlying causes and modification by exercise training. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–58, 2013.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v.

3, n. 11, p. 1009–1013, 2001.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: The role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 577, n. 3, p. 997–1007, 2006.

ROSENFELD, C. S. Homage to the “H” in developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8–29, 2017.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 320–344, 2004.

RUSSELL, A. P. et al. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 591, n. 18, p. 4637–4653, 2013.

SACHECK, J. M. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 287, n. 4 50-4, p. 591–601, 2004.

SADHALE, P.; VERMA, J.; NAOREM, A. Basal transcription machinery: Role in regulation of stress response in eukaryotes. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 569–578, 2007.

SAFARINEJAD, M. R.; AZMA, K.; KOLAHI, A. A. The Effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: A randomized controlled study. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 200, n. 3, p. 259–271, 2009.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2010, 2010.

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**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 160–170, 2008.

SANES, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, 278(15), 12601–12604, 2003.

SATO, S. et al. Elevated levels of TWEAK in skeletal muscle promote visceral obesity, insulin resistance, and metabolic dysfunction. **FASEB Journal**, [s. l.], v.



29, n. 3, p. 988–1002, 2015.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SCHUUR, E. R. et al. Ligand-dependent Interaction of Estrogen Receptor- $\alpha$  with Members of the Forkhead Transcription Factor Family. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 36, p. 33554–33560, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105555200>>

SCIORATI, C. et al. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 927–937, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.171>>

SEILER, F. et al. FOXO Transcription Factors Regulate Innate Immune Mechanisms in Respiratory Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 190, n. 4, p. 1603–1613, 2013.

SERRANO, A. L. et al. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 33–44, 2008.

SHORT, K. R. et al. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. **Diabetes**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 1888–1896, 2003.

SITNICK, M.; BODINE, S. C.; RUTLEDGE, J. C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 587, n. 23, p. 5753–5765, 2009.

SOUSA NETO, I. V. De et al. Paternal Resistance Training Modulates Calcaneal Tendon Proteome in the Offspring Exposed to High-Fat Diet. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, n. June, p. 1–19, 2020.

SOUZA, M. V. C. et al. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. **Clinics**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 265–270, 2014.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 200, n. 4, p. 448–464, 2003.

STANFORD, NAWROCKI, A. R. et al. **Paternal Exercise Improves Glucose Metabolism in Adult Offspring**. [s.l: s.n.]. v. 2

STEIN, A. M. et al. A systematic review of experimental studies in the elderly. **Dement Neuropsychol**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 114–122, 2018.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 463–516, 2001.

STREET, N.; HAWLEY, J. A. Signalling in Rat Skeletal Muscle. [s. l.], v. 110, n.

4, p. 779–788, 2016.

TAM, C. S. et al. The effects of high-fat feeding on physical function and skeletal muscle extracellular matrix. **Nutrition and Diabetes**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 4–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nutd.2015.39>>

TAN, R. J.; LIU, Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [s. l.], v. 302, n. 11, 2012.

TIBANA, R. A. et al. Exercise as an Effective Transgenerational Strategy to Overcome Metabolic Syndrome in the Future Generation: Are We There? **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, [s. l.], v. 125, n. 6, p. 347–352, 2017.

TIBANA, R. A. et al. Effects of different volumes of resistance exercise on the food intake of rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 145–148, 2018.

TIRABY, C. et al. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 35, p. 33370–33376, 2003.

TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 643–663, 2006.

TOMAZINI GONÇALVES, T. et al. Effects of glucosyl-hesperidin and physical training on body weight, plasma lipids, oxidative status and vascular reactivity of rats fed with high-fat diet. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 321–332, 2018.

TRAPPMANN, B. et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. **Nature Materials**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 642–649, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat3339>>

TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 296, n. 6, p. 1258–1270, 2009.

URSO, M. L. et al. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 106, n. 5, p. 655–663, 2009.

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Ageing**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 256–268, 2015.

VIEIRA DE SOUSA NETO, I. et al. Impact of paternal exercise on physiological systems in the offspring. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 231, n. 4, p. 1–15, 2021.

VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMAKI, J. Oxidative and lysosomal capacity in skeletal muscle of mice after endurance training of different intensities. **Acta Physiologica Scandinavica**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 74–81, 1978.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.

WALLENLIUS, V. et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 2002, p. 1–10, 2002.

WANG, S.; GU, K. Insulin-like growth factor 1 inhibits autophagy of human colorectal carcinoma drug-resistant cells via the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 2952–2956, 2018.

WANG, Y. et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 6, 2020.

WATT, F. M.; HUCK, W. T. S. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 467–473, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3620>>

WEST, D. W. D. et al. Acute resistance exercise activates rapamycin-sensitive and -insensitive mechanisms that control translational activity and capacity in skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 594, n. 2, p. 453–468, 2016.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 444–451, 2002.

WIDMANN, M.; NIESS, A. M.; MUNZ, B. Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 509–523, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40279-019-01070-4>>

WILLKOMM, L. et al. P38 MAPK activation and H3K4 trimethylation is decreased by lactate in vitro and high intensity resistance training in human skeletal muscle. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.

WINKLES, J. A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 411–425, 2008.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

XIAOPING, C.; YONG, L. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adhesion and**

**Migration**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2009. a.

XIAOPING, C.; YONG, L. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adhesion and Migration**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 337–341, 2009. b.

YAMADA, M. et al. Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 313–319, 2006.

YAMAMOTO, H. et al. MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 303, n. 12, p. 1419–1427, 2012.

YAN, R.; BASTIAN, N. D.; GRIFFIN, P. M. Association of food environment and food retailers with obesity in US adults. **Health and Place**, [s. l.], v. 33, p. 19–24, 2015.

YAN, Z. et al. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 264–274, 2011.

YIN, L. et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 172, n. August, 2021.

YIN, M. M. et al. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 253, p. 297–304, 2013.

YONG, D. Satellite Cell Activity Is Required for Hypertrophy of. **Processing**, [s. l.], n. June, p. 608–613, 1994.

YOSHIDA, T.; DELAFONTAINE, P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1–25, 2020.

ZANCHI, N. E. et al. Chronic low frequency/low volume resistance training reduces pro-inflammatory cytokine protein levels and TLR4 mRNA in rat skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 1095–1102, 2010.

ZHANG, C. et al. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 3, p. 1489–1499, 2013.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, n. Figure 1, 2016.

ZHOU, J. et al. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 335–347, 2016. Disponivel

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.002>>

ZIMMER, P.; BLOCH, W. Sport und epigenetische Anpassungen des Herz-Kreislauf-Systems. **Herz**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 353–360, 2015.

## Anexo 1 – Artigo na íntegra



# Paternal Resistance Exercise Modulates Skeletal Muscle Remodeling Pathways in Fathers and Male Offspring Submitted to a High-Fat Diet

## OPEN ACCESS

**Edited by:**

Raphael Ritti-Dias,  
Universidade Nove de Julho, Brazil

**Reviewed by:**

Maurício Krause,  
Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Richelle Mychasiuk,

Monash University, Australia

Eric Eyolfson,  
University of Calgary, Canada,  
contributed to the review of RM

**\*Correspondence:**

Rita de Cássia Marqueti  
marqueti@gmail.com

†These authors have contributed  
equally to this work

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Exercise Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 06 May 2021

**Accepted:** 02 September 2021

**Published:** 27 September 2021

**Citation:**

Salomão R, Neto IvdS,  
Ramos GV, Tibana RA, Durigan JQ,  
Pereira GB, Franco OL, Royer C,  
Neves FdAR, Carvalho ACAd,  
Nóbrega OT, Haddad R, Prestes J  
and Marqueti RdC (2021) Paternal  
Resistance Exercise Modulates  
Skeletal Muscle Remodeling  
Pathways in Fathers and Male  
Offspring Submitted to a High-Fat  
Diet. *Front. Physiol.* 12:706128.  
doi: 10.3389/fphys.2021.706128

Rebecca Salomão<sup>1,2†</sup>, Ivo Vieira de Sousa Neto<sup>1,3†</sup>, Gracielle Vieira Ramos<sup>4</sup>,  
Ramires Alsamir Tibana<sup>5</sup>, João Quaglioti Durigan<sup>2</sup>, Guilherme Borges Pereira<sup>6</sup>,  
Octávio Luiz Franco<sup>7,8</sup>, Carine Royer<sup>1,9</sup>, Francisco de Assis Rocha Neves<sup>9</sup>,  
Ana Carolina Andrade de Carvalho<sup>9</sup>, Otávio Toledo Nóbrega<sup>10,11</sup>, Rodrigo Haddad<sup>11,11</sup>,  
Jonato Prestes<sup>12</sup> and Rita de Cássia Marqueti<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Analysis, Faculty of Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup> Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>3</sup> Graduate Program of Sciences and Technology of Health, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>4</sup> Institute of Health Sciences – Universidade Paulista, São Paulo, Brazil, <sup>5</sup> Graduate Program in Health Sciences, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brazil, <sup>6</sup> Interinstitutional Program of Post-Graduation in Physiological Sciences (UFSCar/UNESP), Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>7</sup> Graduate Program in Genomics Science and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>8</sup> S-Inova Biotech, Graduate Program in Biotechnology, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil, <sup>9</sup> Laboratory of Molecular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>10</sup> Graduate Program of Medical Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>11</sup> Center for Tropical Medicine, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>12</sup> Graduate Program of Physical Education, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

Although some studies have shown that a high-fat diet (HFD) adversely affects muscle extracellular matrix remodeling, the mechanisms involved in muscle trophism, inflammation, and adipogenesis have not been fully investigated. Thus, we investigated the effects of 8 weeks of paternal resistance training (RT) on gene and protein expression/activity of critical factors involved in muscle inflammation and remodeling of fathers and offspring (offspring exposed to standard chow or HFD). Animals were randomly distributed to constitute sedentary fathers (SF;  $n = 7$ ; did not perform RT) or trained fathers (TF  $n = 7$ ; performed RT), with offspring from mating with sedentary females. After birth, 28 male pups were divided into four groups ( $n = 7$  per group): offspring from sedentary father submitted either to control diet (SFO-C) or high-fat diet (SFO-HF) and offspring from trained father submitted to control diet (TFO-C) or high-fat diet (TFO-HF). Our results show that an HFD downregulated collagen mRNA levels and upregulated inflammatory and atrophy pathways and adipogenic transcription factor mRNA levels in offspring gastrocnemius muscle. In contrast, paternal RT increased MMP-2 activity and decreased IL-6 levels in offspring exposed to a control diet. Paternal RT upregulated *P70s6k* and *Ppara* mRNA levels and downregulated *Atrogin1* mRNA

levels, while decreasing NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , and IL-8 protein levels in offspring exposed to an HFD. Paternal physical training influences key skeletal muscle remodeling pathways and inflammatory profiles relevant for muscle homeostasis maintenance in offspring submitted to different diets.

**Keywords:** exercise, intergenerational, gastrocnemius, atrophy/hypertrophy signaling, proinflammatory cytokines, protein turnover, adipogenic

## INTRODUCTION

Obesity and its comorbidities represent a global health problem that has become a major social and economic burden worldwide. Overweight and obesity are often causally linked to marked alterations in lifestyle, such as increases in high-energy dietary intake, as well as a high prevalence of physical inactivity. In rodent models, a high-fat diet (HFD) promotes accumulation of intramyocellular lipids that induce muscular lipotoxicity, chronic inflammation, oxidative stress, and glucose metabolism abnormalities (Bollheimer et al., 2012; Trajcevski et al., 2013). Among the relevant signaling pathways, NF- $\kappa$ B has emerged as a critical transcription factor that induces the expression of many proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-12) involved in the skeletal muscle atrophy process (Carlsen et al., 2009). In addition, NF- $\kappa$ B upregulation becomes evident in many catabolic scenarios associated with an increased ubiquitin-proteasome system and autophagy (Demasi and Laurindo, 2012; Sandri, 2013; Abrigo et al., 2016), which in turn might lead to cell damage and muscle disorders.

The inflammatory condition is also closely related to dysfunctional extracellular matrix (ECM) remodeling in skeletal muscle, corroborating musculoskeletal disorders (Tam et al., 2015). Tam et al. (2015) found downregulation of mRNA levels in collagen I, III, and VI in the gastrocnemius muscle of C57BL/6 mice fed an HFD for 5 weeks, indicating imbalance in ECM homeostasis, whose remodeling is regulated by matrix metalloproteinases (MMPs) essential to maintain a favorable environment for structural support, mechanical stability, and transmission of signals from muscle cells. It has been shown that MMP-2 deficiency promotes abnormal changes in collagen (Martinez-Huenchullan et al., 2017), which is crucial to force transmission among fibers and fascicles in the muscle contraction process (de Sousa Neto et al., 2017). The decrease in MMP-2 activity may also impair the release of local growth factors (TGF- $\beta$ , CTGF, and IGF-1) and proliferation, differentiation, and migration of satellite cells responsible for muscle hypertrophy (Martinez-Huenchullan et al., 2017). Although some studies have already shown that HFD adversely affects muscle ECM remodeling, the mechanisms involved in the muscle trophism, inflammation, and adipogenesis have not yet been fully investigated. Hence, further studies are required to determine the harmful effects caused by an HFD in skeletal muscle.

Resistance exercise training (RT) is a potent lipolysis mediator, preventing intramyocellular lipid expansion in skeletal muscle, linked to the PPAR $\gamma$ -mediated mechanism (Ribeiro et al., 2017). The role of RT on skeletal muscle confers beneficial effects on adipogenic transcriptional factors (CCAAT/enhancer-binding

proteins), suppressing proinflammatory factors (Guedes et al., 2020) and abnormal ECM remodeling (Guzzoni et al., 2018). Furthermore, RT protects against obesity-induced muscle atrophy, via activation of the anabolic signaling axis (*IGF1*, *AKT*, *P70sk6*, and *MyoD*) (Glover and Phillips, 2010). Currently, it is widely accepted that a future generation inherits protective exercise-mediated effects through epigenetics inheritance (Vieira de Sousa Neto et al., 2021). The RT performed by fathers represents a potential regulator of intergenerational inheritance and is a cost-effective strategy to improve the health of the first offspring exposed to an HFD (Vieira de Sousa Neto et al., 2021). Thus, the father's behavior may modulate key players responsible for skeletal muscle remodeling in the offspring.

Previous evidence demonstrated that paternal RT (8 weeks, three times per week) induced protective effects on the left ventricle and tendon proteome of offspring exposed to an HFD through the increase in abundance proteins involved in cellular survival pathways, tissue integrity maintenance, and overall homeostasis (ECM organization, heart contraction, metabolic processes, antioxidant activity, transport, and transcription regulation) (de Sousa Neto et al., 2020a,b). Likewise, Stanford et al. (2018) showed that voluntary paternal running on a wheel (3 weeks with running distances averaging  $5.8 \pm 0.4$  km/day) suppresses the detrimental effects of paternal HFD on offspring, reducing fat mass and glucose uptake in the gastrocnemius, tibialis anterior, extensor digitorum longus, and soleus, which suggests that paternal programming may regulate developmental heritages of offspring diseases. However, the extent to which paternal RT leads to orchestrated molecular changes in offspring skeletal muscle exposed to different diets has not been investigated. The climbing a ladder provides an alternative means of inducing force overload with advantages when improving rat musculoskeletal properties and neuromuscular function (Hornberger and Farrar, 2004), while voluntary wheel running may have limited effects on muscle hypertrophy process (Legerlotz et al., 2008; Kurosaka et al., 2009).

Skeletal muscle adaptation is a complex process involving crosstalk of multiple regulatory mechanisms and intracellular pathways (Potthoff et al., 2007). Identifying essential genes and proteins involved in signaling inflammation, atrophy/hypertrophy molecules, and ECM remodeling could provide meaningful insights into the offspring muscle dysfunctions. A mechanistic framework of controlled paternal RT effects may yield clinically useful information and design interventions to effectively counterbalance harmful responses inherent to HFD. Thus, whether the father's lifestyle modulates the musculoskeletal system remains a valid question for muscle health and treatment guidance. The purpose of this study was

to investigate the effects of 8 weeks of paternal RT on gene and protein expression/activity of crucial factors involved in muscle inflammation and remodeling of fathers and offspring (offspring exposed to standard chow or HFD). We hypothesized that paternal RT could minimize maladaptive responses at the transcriptional level (inflammatory factors, atrophy-associated genes, and ECM markers), proinflammatory cytokines levels, and ECM protein turnover pathways impaired by HFD.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Experimental Groups

All procedures were conducted following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) in compliance with the ARRIVE guidelines. The research protocol received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation from the Universidade Católica de Brasília, Brasília (protocol No. 010/13). Initially, fourteen ( $n = 14$ ) 4-month-old *Wistar* rats (*Rattus norvegicus albinus*, weighing  $359 \text{ g} \pm 32.4$ ) were obtained from the Central Vivarium of the Faculty of Physical Education of the Universidade Católica de Brasília. The animals were housed in collective cages (maximum of four rats per cage) and received water and standard feed for rodents *ad libitum* during the experimental period. The animals were randomly distributed into two subgroups: sedentary fathers (SF;  $n = 7$ ; did not perform RT) and trained fathers (TF;  $n = 7$ ; performed RT).

### Paternal Resistance Training

The RT protocol was adapted from Hornberger and Farrar (2004), according to the requirements of this study. In addition, the procedures have been described in previous intergenerational studies (de Sousa Neto et al., 2020a,b). The RT protocol was carried out for 8 weeks, with the climbs performed three times a week (Monday, Wednesday, and Friday) in the afternoon (between 2 and 4 p.m.). Initially, the rats were adapted to the resistance exercise protocol, which required the animals to climb a vertical ladder ( $1.1 \times 0.18 \text{ m}$ , 2 cm step, 80% climb angle) with the load apparatus fixed to their tail, via a self-adhesive foam strip wrapped around the proximal portion. The size of the steps meant the animals performed 8–12 movements per climb. In the familiarization phase, the rats were placed at the bottom of the stairs and were stimulated to climb with a weight attached to the tail. If necessary, a stimulus through finger tweezers was applied to the animal's tail to start the movement. At the top of the stairs, the rats reached a house chamber ( $20 \times 20 \times 20 \text{ cm}$ ) where they rested for 2 min. This procedure was repeated until the animals could voluntarily climb the subsequent set without stimulation (de Sousa Neto et al., 2018). The familiarization sessions were performed three times with an interval of 48 h.

Three days after familiarization, each animal was evaluated to determine its maximum load capacity, which consisted of 4–8 ladder climbs with gradually heavier loads. The initial climb consisted of carrying a load corresponding to 75% of the animal's body weight. After that, weights of 30 g were added progressively until the rat was unable to complete the climb. Failure to climb

was determined when the animal was unable to complete the climb after three successive tail stimuli. The highest load carried to the top of the stairs was considered the maximum load capacity of the rat for that specific training session. After defining the maximum load capacity, the training sessions comprised eight climbs (TF), two sets with each load of 50, 75, 90, and 100% of the animal's maximum load capacity. Average feed intake was measured for each experimental group 24 and 48 h after the first RT session and 72 h after the second RT session.

In each week, respecting the progressive overload principle of the training, 30 g (approximately 13% of the animal's body weight) were added, referring to the weight of the previous week with 100% of the maximum loading capacity, in order to guarantee the desired stress resulting from the exercise.

### Offspring Groups

The offspring came from mating with sedentary females. The estrous cycle of the females was checked daily after completing the RT. The male rats were mated with primigravidae females during the proestrus phase, housing together for two consecutive days with free access to a control diet (Purina®, Descalvado-SP, Brazil) water.

After birth, the experimental groups in this study consisted of 28 male pups. The litters were standardized to 7 pups each to avoid litters of different sizes and were left with their mothers for 21 days of breastfeeding. The litters belonging to the same experimental group were descended from different parents.

After weaning, male pups were divided into 4 groups ( $n = 7$  per group): offspring from sedentary father submitted either to control diet (SFO-C) or high-fat diet (SFO-HF) and offspring from trained father submitted to control diet (TFO-C) or high-fat diet (TFO-HF). The animals were housed in polypropylene cages with a temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and light:dark cycle of 12:12 h. The pups were weighed, in grams, on a digital scale, weekly for 6 months (Filizola®, São Paulo, Brazil).

### Offspring Diet

The offspring submitted to the control diet (SFO-C and TFO-C) were fed with standard feed (66.00% carbohydrates, 24.00% protein, and 10.00% lipids, totaling 3.48 Kcal/g, Labina Presence®, Paulínia, São Paulo, Brazil) and water *ad libitum*. Females were also kept on the control diet during gestation and lactation periods. The SFO-HF and TFO-HF groups were submitted to the commercially acquired HF diet (20.27% carbohydrates, 19.89% protein, and 59.38% lipids, totaling 5.20 Kcal/g) (Prag® solutions, Biosciences, Jaú, Brazil) and an overload of 200 mL of soft drink (high-fructose corn syrup, caramel coloring, caffeine, and phosphoric acid) per week (100% carbohydrates—21 g, sodium: 10 mg totaling 0.85 Kcal/g), in addition to having free access to water from the 21st day after birth for 6 months. Detailed compositions of the experimental diets were reported previously (de Sousa Neto et al., 2020b).

Some studies have demonstrated the efficacy of this HFD model in body weight gain and adiposity in *Wistar* rats (Goncalves et al., 2018; de Sousa Neto et al., 2020b). Soft drinks for rats are used as a complement and characterization of the HF diet and are an effective strategy to promote the increase



in total energy intake and body weight gain in the long term (Messier et al., 2007; Lozano et al., 2016). The offspring were weighed weekly on a digital scale (Filizola, São Paulo, Brazil) until euthanasia. The experimental design of the study is shown in Figure 1.

### Euthanasia

Fathers were euthanized with an intraperitoneal injection of xylazine solution (12 mg/kg body weight) and ketamine (95 mg/kg body weight), 48 h after the training period to avoid the acute effects of exercise. The offspring were euthanized with the same combination of solutions after 6 months of exposure to the HFD. Afterward, the medial gastrocnemius muscles were immediately dissected from each posterior hindlimb and one part was frozen in RNase-free tubes using liquid nitrogen (for qPCR, cytokines, zymography, and western blotting) and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further molecular analysis related to skeletal muscle remodeling. An experienced researcher dissected all muscles to prevent contamination of other tissues.

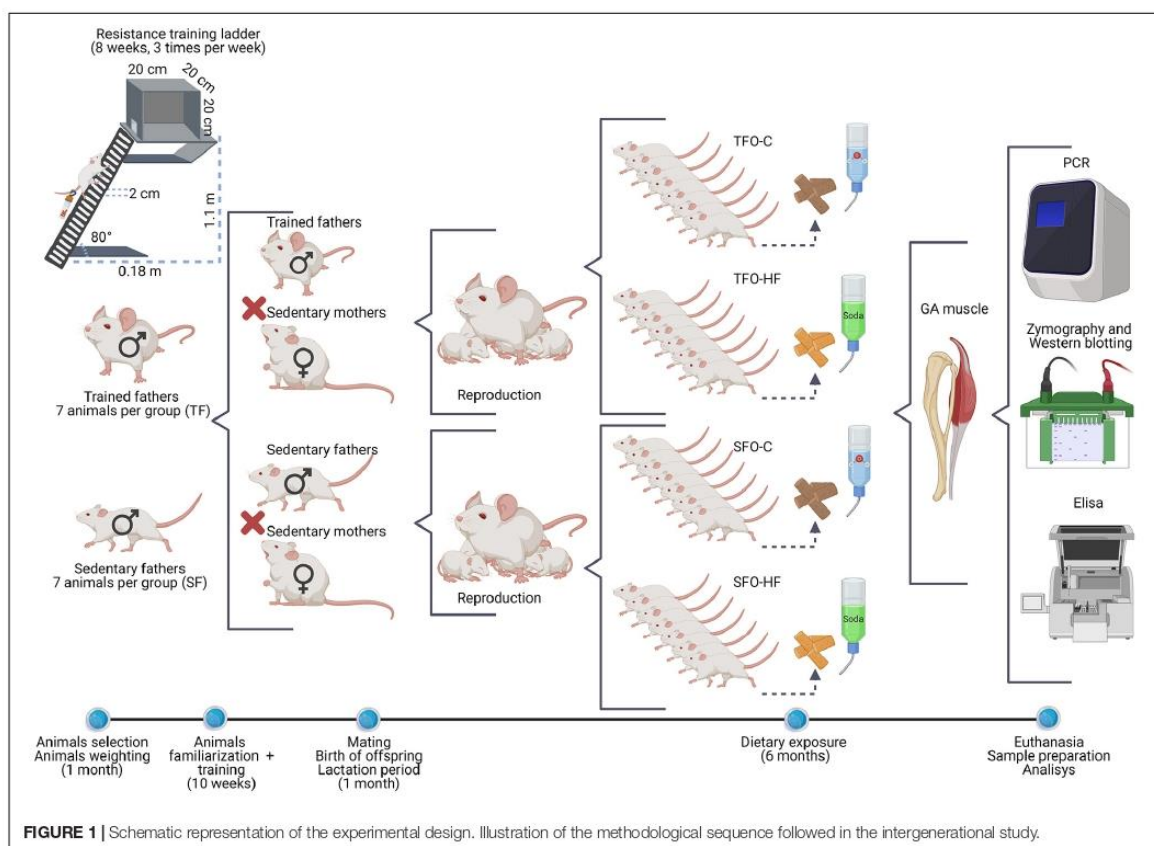
### RNA Extraction

Tissue samples from 28 animals (7 per group) were homogenized in a tube containing five stainless steel balls (diameter, 2.3 mm)

(BioSpec Products, Bartlesville, OK, United States), three sharp silicon carbide particles (1 mm) (BioSpec Products), and TRIzol, by shaking using a FastPrep-24 instrument (M.P. Biomedicals, Solon, OH, United States) (Marqueti et al., 2012). In order to thoroughly homogenize the tissue, the shaking process was repeated five times at speed 4. The tubes were kept in ice-cooling for 2 min to avoid RNA degradation between each shaking step. The total RNA was extracted according to the TRIzol method described by Chomczynski and Sacchi (1987). A NanoDrop<sup>®</sup> spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, United States) was used to quantify the RNA concentrations in each sample, determining the absorbance rate of 260–280 nm. Subsequently, samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  up to purification.

### One Step RT-qPCR

To assess the gastrocnemius muscle gene expression, a total of 100–350 ng of RNA extracted from each sample was converted to cDNA (final volume 20  $\mu\text{L}$ ) using GoTaq<sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR (Promega-Cat. A6120X) based on the manufacturer's protocol. The standard cycling conditions to perform reverse transcription and amplification of samples were: (a) Reverse transcription (1 cycle):  $45^{\circ}\text{C}$  for 15 min; (b) reverse transcriptase



inactivation and GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase activation (1 cycle): 95°C for 2 min; (c) Denaturation (40 cycles): 95°C for 15 s; and (d) Annealing and extension (40 cycles): 60°C for 1 min.

### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed with the aid of the GoTaq<sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega—Cat. A6120X). Ten microliters of the GoTaq Probe qPCR Master Mix with dUTP were homogenized with 1 µL of the 20 × primer, an amount of RNA (100–350 ng), 0.4 µL GoScript RT Mix for 1-Step RT-qPCR 1X, and water for a final volume of 20 µL. The qRT-PCR was performed using a QuantStudio 3 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) for the following genes (Table 1):

The normalization of the expression from each target gene occurred through the expression of the constitutive gene RPLP0, which was used as the endogenous control of RNA, due to the lower intra and intergroup variability compared with the other housekeeping genes tested (Beta-actin and Gapdh, also tested in this study). The  $\Delta Ct$  values of the samples were determined by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the maintenance gene. Next, the  $\Delta \Delta Ct$  values were calculated by subtracting the  $\Delta Ct$  value from the condition of interest from the  $\Delta Ct$  value from the control condition. Finally,  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  values were calculated to present data of relative expression. The sample quantity and the reaction efficiency of each gene analyzed in the present study were determined from a standardization curve, with slope reference parameters equal to  $-3.3$ ,  $R^2 = 0.9$ – $1.0$ , and efficiency above 90%. These genes

were chosen because a HFD induces substantial muscle atrophy, inflammation, and dysfunctional ECM remodeling in the skeletal muscle (Tam et al., 2015; Abrigo et al., 2016).

### Cytokine Levels

The quantification of total proteins was performed in a NanoDrop<sup>®</sup> 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) using a 260/280 nm relation. Cytokine concentrations were determined by a multiplexed flow cytometry method using bead-based immunoassays developed by the BD Biosciences<sup>®</sup> (CBA, San Diego, CA, United States), specific for the following mediators: Interleukin (IL)-1beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). Assessments were performed according to the manufacturer's protocols. Reconstituted cytokine standards and the thawed serum samples were processed using the BD FACS Verse cytometer. Two hundred events or more were acquired for each cytokine bead. Data were analyzed using FCAP software, version 3.0 (BD Biosciences<sup>®</sup>, San Diego, CA, United States). Standard curves for each cytokine were generated using serial dilutions of the mediators supplied, with each sample titrated by linear interpolation. All samples were determined in duplicate to guarantee reliability.

### Gelatin Zymography

The zymography technique was used to measure MMP-2 activity. The gastrocnemius muscle extracts were homogenized and incubated in extraction buffer (10 mM cacodylic acid, pH 5.0; 0.15 M NaCl; 1 µM ZnCl<sub>2</sub>; 20 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.5 mM NaN<sub>3</sub>, and 0.01% Triton X-100) with five stainless steel balls (diameter, 2.3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, United States) and three silicon-carbide sharp particles (1 mm) (BioSpec Products) by being shaken in a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, United States). Next, the solution was centrifuged for 30 min (13,000 g at 4°C), and the supernatant was reserved. A NanoDrop spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, United States) was used to quantify protein concentrations. Thirty mg of total protein were loaded into each lane. The samples were concentrated in 30 µg of protein and 10 µL of sample buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol (reducing agent) and were resolved by electrophoresis on polyacrylamide gel with SDS and gelatin, in the final concentration of 1 mg/mL. After the run, the gel was washed twice for 20 min in 2.5% Triton X-100 solution to remove the SDS. Next, the gel was incubated in the substrate buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CaCl 2.5 mM; NaN<sub>3</sub> 0.02%, and ZnCl<sub>2</sub> 10 mM), at 37°C, for 18 h. Subsequently, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue for 60 min. Afterward, the gel was washed in a solution of methanol 30% and acetic acid 10%. The averages of the band intensities were measured using Image Master 2D Platinum 7.0 software and conducted by a blinded researcher, attenuating possible bias related to this process. Pro and active isoform bands were identified via standard techniques using molecular weight criteria. The bands found in all groups were 72–64 kDa, as proposed by previous studies that evaluated MMP-2 in the skeletal muscle (de Sousa Neto et al., 2017, 2018). The assurance of the analysis

**TABLE 1** | List of tested genes associated with extracellular matrix, inflammation, metabolism, and myogenesis.

mRNA	Code (life technologies)	mRNA	Code (life technologies)
<i>Actb</i>	rn00667869	<i>Murf1</i>	rn00590197
<i>Akt1</i>	rn00583646	<i>Myod</i>	rn01511496
<i>Atrogin1</i>	rn00591730	<i>Nfkb</i>	rn00595794
<i>Cebpa</i>	rn00560963	<i>Ppara</i>	rn00566193
<i>Col1a1</i>	rn01463848	<i>P70s6k</i>	rn00583148
<i>Col3a1</i>	rn01437681	<i>Rplp0</i>	rn03302271
<i>Ctgf</i>	rn01537279	<i>Tgfb1</i>	rn00572010
<i>Foxo1</i>	rn01494868	<i>Tnfa</i>	rn03126850
<i>Gapdh</i>	rn01775763	<i>Tweak</i>	rn01461586
<i>Igf1a</i>	rn00710306	<i>Mmp2</i>	rn01538170
<i>Ilf6</i>	rn01410330		

*Actb*, Actin beta; *Akt1*, AKT serine/threonine kinase 1; *F-box protein 32* (also known as *Atrogin1*); *Cebpa*, CCAAT/enhancer binding protein alpha; *Col1a1* and *Col3a1*, respectively, collagen 1 alpha 1 and collagen 3 alpha 1; *Ctgf*, connective tissue growth factor; *Foxo1*, forkhead box O1; *Igf1*, insulin-like growth factor 1; *Ilf6*, interleukin 6; *Mmp2*, matrix metalloproteinase 2; *Murf1*, tripartite motif containing 63; *Myod*, myogenic differentiation; *Nfkb*, nuclear factor kappa beta; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *ribosomal protein S6 kinase beta-1* (also known as *P70s6k*); *Rplp0*, ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *Tgfb1*, transforming growth factor, beta 1; *Tnfa*, tumor necrosis factor alpha; *Tweak*, TNF superfamily member 12.

accuracy, the gels for zymography were prepared simultaneously using the same solutions. Gels electrophoresis was carried out simultaneously using fresh buffers at the same condition and temperature (inside the fridge) to minimize the variation between the gels. Furthermore, protein normalization, voltage and time during electrophoresis, as well gel staining background, have been carefully standardized.

### Western Blot Assay

Total proteins were extracted from tissues using phosphate buffer saline (PBS 1%, pH 7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche, Germany) with five stainless steel balls (diameter, 2.3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, United States) and three silicon-carbide sharp particles (1 mm) (BioSpec Products) by being shaken in a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, United States). After this, the samples were centrifuged (14,000 g for 30 min at 4°C). The supernatant was transferred to a new tube and the protein concentration was determined using a NanoDrop® spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, United States). The protein (20 µg) was separated using 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore). The membranes were blocked using 5% non-fat milk in TBST buffer [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl, 0.1% Tween 20] for 2 h and then incubated with the primary monoclonal antibodies: COL1A1 (Sigma Aldrich, C2456), NF-κB p65 (Cell Signaling Technology, #4764), and PPAR-α (Santa Cruz Biotechnology, sc-9000) overnight at 4°C. Next, the membrane was incubated with secondary anti-mouse IgG antibody -HRP (Santa Cruz Biotechnology, Sc-2005) or anti-rabbit IgG antibody -HRP (Cell Signaling Technology, #7074) for 1 h at room temperature. Chemiluminescence was detected using an ECL western blotting detection kit (GE Healthcare, Chicago, IL, United States). Densitometry was performed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The intensity related to the analyzed protein was normalized to the GAPDH band (A1978, Sigma Aldrich). The gels for western blot assay were prepared simultaneously using the same solutions to assure the analysis accuracy. Gels electrophoresis was carried out simultaneously using fresh buffers at the same condition and temperature to minimize the variation between the gels. Furthermore, protein normalization, voltage and time during electrophoresis have been carefully standardized. We also choose the best normalization standard; it was confirmed the primary antibody's quality (monoclonal), prevented signal saturation and accurately quantifying the signal intensity of the target protein.

### Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of data, and the Levene test was used to analyze the homogeneity of the variance. Two-way ANOVA (diet x paternal training) was used to compare the dependent variables between the four groups of offspring. When a significant difference was detected, the Tukey *post hoc* test was applied to identify where the difference occurred. An alpha level of  $p \leq 0.05$

was considered significant. The software GraphPad Prism 8.3 (San Diego, CA, United States) was used for statistical analysis and graphics design. The results from gene expression were presented according (Heinemeier et al., 2007; Marqueti et al., 2018; Barin et al., 2019). The mRNA gene expression was log-transformed for the statistical analyses to obtain normal distribution. Data are presented in graphs as geometric mean ± back-transformed standard error (SE) calculated as follows: Geometric mean =  $2^{\text{or } 10^{\text{logarithmic mean}}}$ . The geometric mean at  $2^{\text{or } 10^{\text{logarithmic mean}}}$  was used only when the logarithmic value was higher than 1,000. Back-transformed positive SE =  $2^{\text{or } 10^{\text{logarithmic mean + logarithmic SE}}} - \text{geometric mean}$ . Back-transformed negative SE =  $\text{geometric mean} - 10^{\text{logarithmic mean + logarithmic SE}}$ . The mRNA data are presented on a logarithmic scale as fold changes relative to the mean of the young sedentary group. For this reason, the values for SF and SFO-C groups are always "1." Biorender web-based software was used to create the study design and the final figure (License Number QH22U934HD).

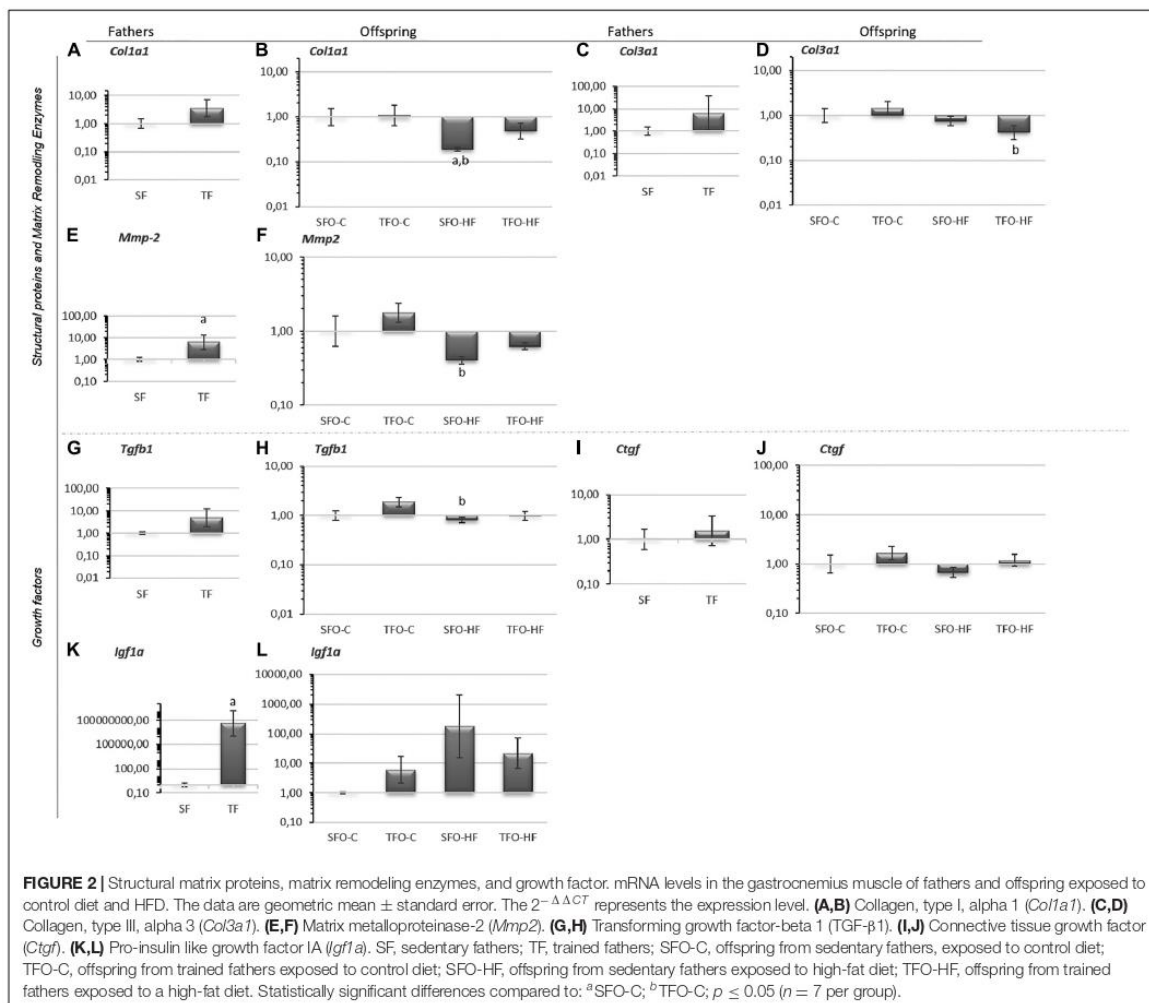
## RESULTS

### Effects of High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Offspring Body Weight Gain and Adiposity Index

Offspring exposed to the HFD showed a higher body weight and adiposity index when compared with the offspring exposed to the control diet ( $p = 0.001$ ) following 6 months of diet exposure, based on previously published works (de Sousa Neto et al., 2020a,b). Paternal RT attenuated the body weight gain (TFO-HF =  $398.8 \pm 8.1$  vs. SFO-HF  $433.9 \pm 34.7$ ;  $p = 0.001$ ) and adiposity index (TFO-HF =  $2.63 \pm 0.68$  vs. SFO-HF =  $4.75 \pm 0.95$ ) in the offspring submitted to an HFD. No statistical changes in body weight were observed between the TFO-C and SFO-C groups.

### Effects of High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Structural Matrix Proteins, Matrix Remodeling Enzymes, and Growth Factor mRNA Levels in the Gastrocnemius Muscle

There were no differences between sedentary and trained fathers in mRNA levels of *Coll1a1*, *Col3a1*, *Tgfβ1*, *Ctgf* ( $p > 0.05$ ; Figures 2A,C,G,I, respectively), while *Mmp2* and *Igf1a* mRNA levels were significantly upregulated in the trained fathers ( $p = 0.03$  and  $p = 0.001$ , Figures 2E,K, respectively). Regarding offspring, *Coll1a1* mRNA levels were significantly downregulated with HFD (SFO-HF vs. SFO-C;  $p = 0.03$ ; Figure 2B). Furthermore, HFD downregulated *Col3a1* mRNA levels in the offspring from trained fathers (TFO-HF vs. TFO-C group;  $p = 0.04$ , Figure 2D). However, paternal RT did not modulate structural matrix proteins, matrix remodeling enzymes, and growth factor mRNA levels in the offspring ( $p > 0.05$ ; Figures 2F,H,J,L, respectively).



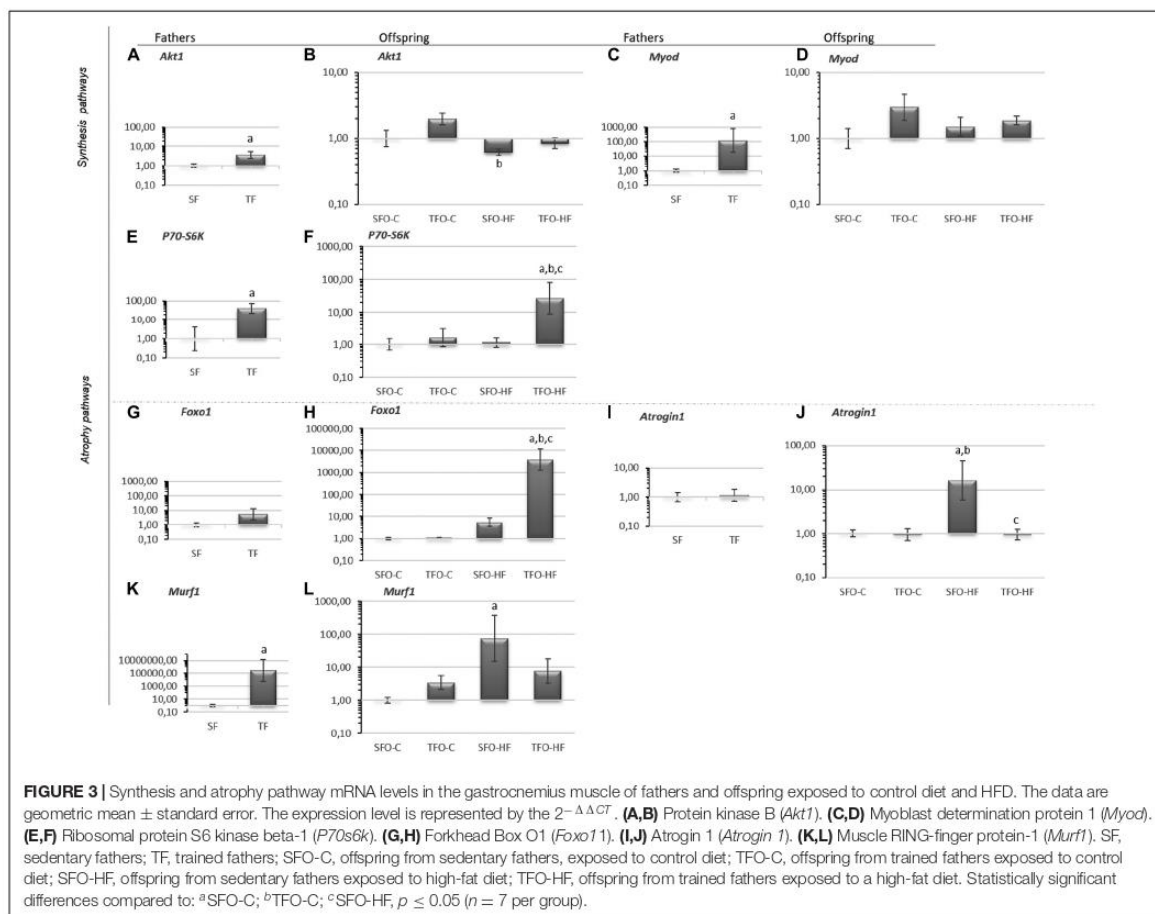
### Effects of High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Synthesis and Atrophy Pathway mRNA Levels in the Gastrocnemius Muscle

*Akt1*, *MyoD*, *P70S6K*, and *Murf1* mRNA levels were increased after RT in trained fathers ( $p = 0.01$ ; **Figures 3A,C,E,K**, respectively). Despite the difference presented in the Akt graph (SFO-HF vs. TFO-C;  $p = 0.01$ ; **Figure 3B**) it did not cause any significant comparison. No changes were observed in fathers for mRNA levels of *Foxo1* ( $p > 0.05$ ; **Figure 3G**) and *Atrogin1* ( $p > 0.05$ ; **Figure 3I**). Regarding offspring, *Atrogin1* and *Murf1* mRNA levels were significantly upregulated with HFD (SFO-HF vs. SFO-C;  $p = 0.008$  and  $p = 0.01$ ; **Figures 3J–L**). Paternal RT upregulated *P70s6k* and *Foxo1* mRNA levels in the TFO-HF group when compared to the SFO-HF group ( $p = 0.03$  and  $p = 0.001$ ; **Figures 3E,H**,

respectively). Additionally, paternal RT mitigated the HFD-associated increase in *Atrogin1* mRNA levels of offspring (TFO-HF vs. SFO-HF;  $p = 0.007$ ; **Figure 3J**). No changes were observed in mRNA levels of *MyoD* between offspring groups ( $p > 0.05$ ; **Figure 3D**).

### Effects of the High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Inflammatory Pathways, Adipogenic Transcription Factor, and Transcription Factor Regulator of Lipid Metabolism mRNA Levels in the Gastrocnemius Muscle

No changes were observed in inflammatory pathway mRNA levels in the fathers ( $p > 0.05$ ; **Figures 4A,C,E,G**). *Cebpa* and *Ppara* mRNA levels were increased in the trained fathers when



compared with sedentary fathers ( $p = 0.04$  and  $p = 0.01$ , respectively; **Figures 4I,K**). Regarding offspring, no changes were observed in *Tnfr* mRNA levels ( $p > 0.05$ ; **Figure 4B**). *Tweak*, *Cebpa*, and *Nfkb* mRNA levels were significantly upregulated with HFD (SFO-HF vs. SFO-C;  $p = 0.01$ ; **Figures 4D,J,H**, respectively). Paternal RT upregulated *Ppara* mRNA levels in the TFO-HF group when compared to the SFO-HF group ( $p = 0.0001$ , **Figure 4L**). No changes were observed in mRNA levels of *Il6* between offspring groups ( $p > 0.05$ ; **Figure 4F**).

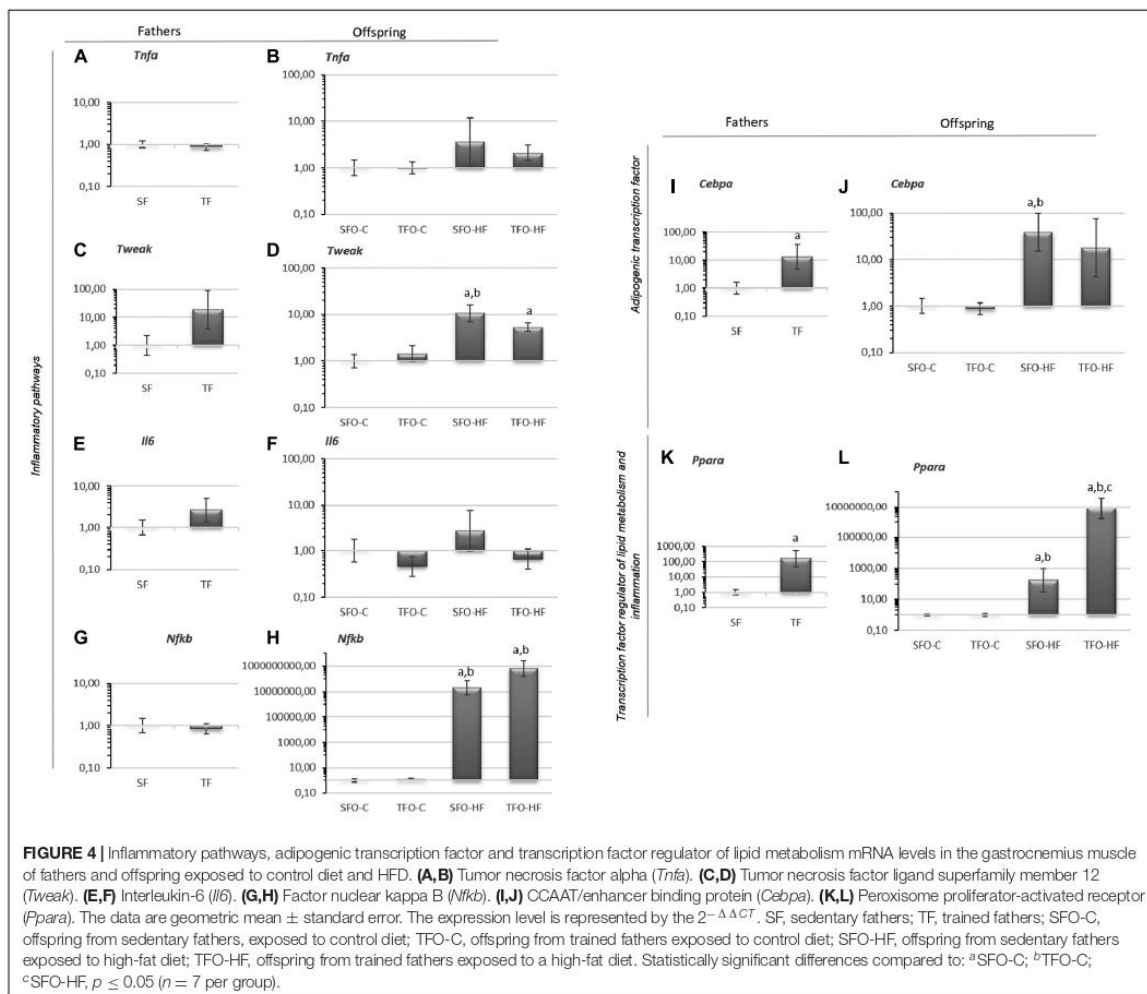
### Effects of High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Levels in the Gastrocnemius Muscle

HFD did not modulate proinflammatory and anti-inflammatory cytokine levels in the offspring's gastrocnemius muscle ( $p > 0.05$ ; **Figure 5**). However, paternal RT decreased IL-6 levels in the TFO-C group when compared to the SFO-C group ( $p = 0.03$ ; **Figure 5C**). Moreover, paternal RT decreased the IL-1 $\beta$  levels in

the offspring exposed to HFD. (TFO-HF vs. SFO-HF;  $p = 0.03$ ; **Figure 5A**). Of note, IL-8 levels changed similarly in fathers and offspring, showing downregulation in the groups under the RT regimen (TF vs. SF;  $p = 0.04$  and TFO-HF vs. SFO-HF;  $p = 0.004$ ; **Figures 5E,F**, respectively). No changes were observed in IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$  levels between offspring groups ( $p > 0.05$ ; **Figures 5H,J,L**, respectively).

### Effects of High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on MMP-2 Activity in the Gastrocnemius Muscle

The pro and active MMP-2 activity increased in the gastrocnemius muscle of fathers in response to RT (TF vs. SF;  $p = 0.001$  and  $p = 0.002$ , respectively, **Figures 6A,C**). No changes were observed in the pro-MMP-2 activity of offspring ( $p > 0.05$ ; **Figure 6B**). The active MMP-2 activity was significantly decreased with HFD in the offspring from trained fathers (TFO-C vs. TFO-HF;  $p = 0.003$ ; **Figure 6D**). On the other hand, paternal RT increased active MMP-2 activity in the



TFO-C group when compared to the SFO-C group ( $p = 0.01$ ; **Figure 6D**). MMP-9 activity was not detected by zymography.

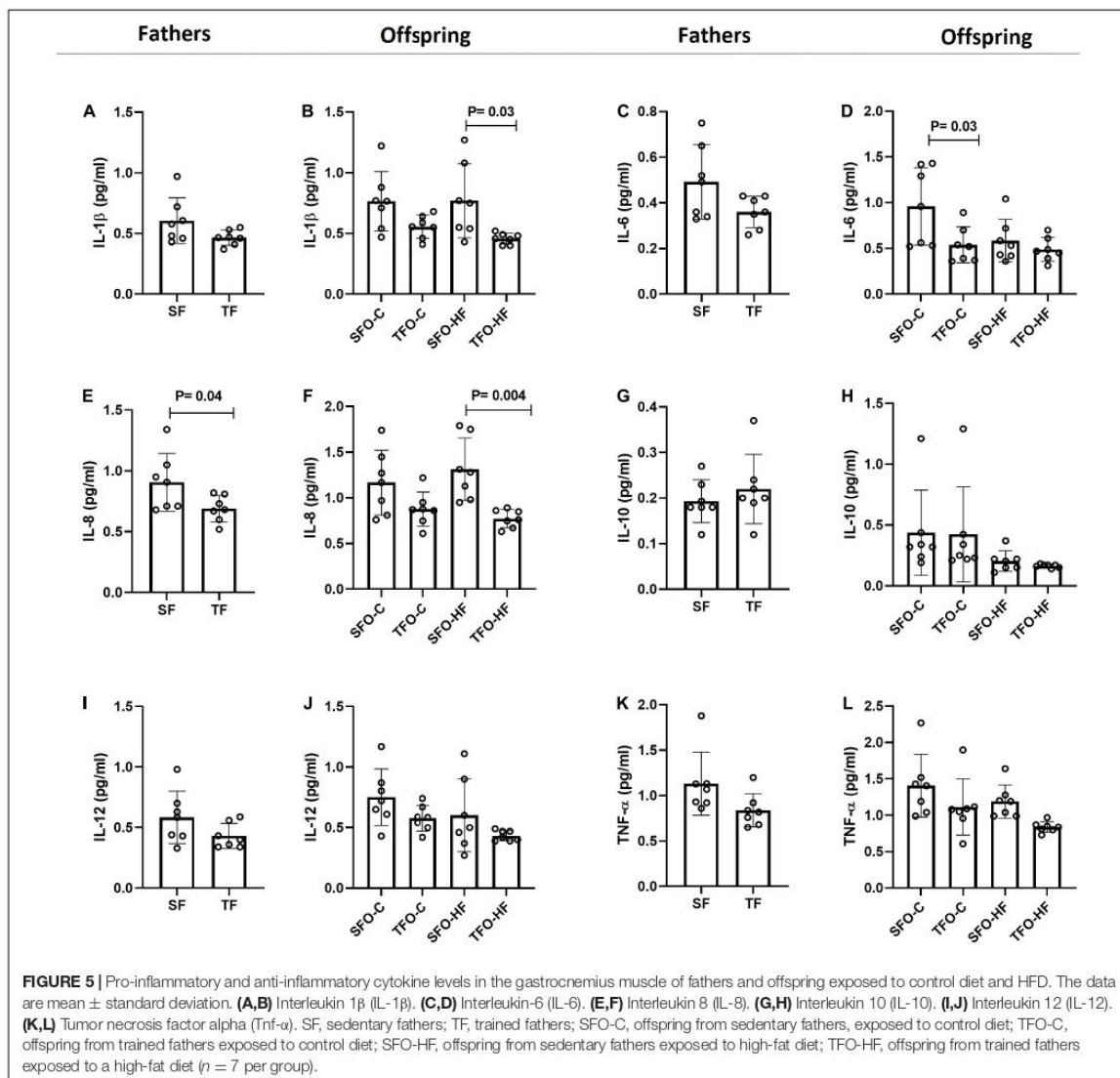
vs. SFO-HF;  $p = 0.01$ ; **Figure 7D**). **Supplementary Data 1** shows  $p$ -values of factors (diet and paternal training) and interaction.

### High-Fat Diet and Paternal Resistance Training on Col1, NF $\kappa$ -B, and PPAR- $\alpha$ Protein Levels in the Gastrocnemius Muscle

There were no differences between sedentary and trained fathers in Col1, NF $\kappa$ -B, and PPAR- $\alpha$  protein levels in the gastrocnemius muscle ( $p > 0.05$ ; **Figures 7A,C,E**, respectively). HFD did not modulate Col1, NF $\kappa$ -B, and PPAR- $\alpha$  protein levels in the offspring from sedentary fathers (SFO-HF vs. SFO-C  $p > 0.05$ ; **Figures 7B,D,F**, respectively). Intriguingly, the TFO-C group displayed higher levels of NF $\kappa$ -B when compared to the TFO-HF group ( $p = 0.0001$ ; **Figure 7D**). However, paternal RT decreased the NF $\kappa$ -B protein level in offspring exposed to HFD (TFO-HF

### DISCUSSION

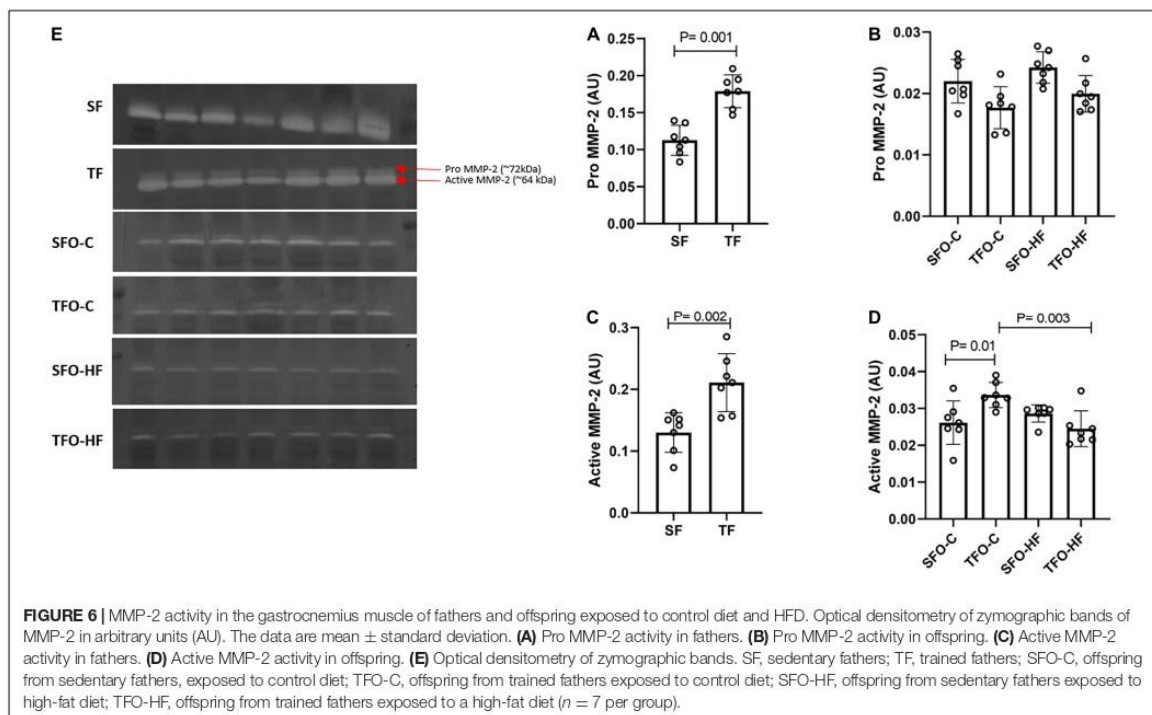
The present study was designed to explore the role of pre-conceptual paternal RT on essential molecules involved in the skeletal muscle remodeling of offspring exposed to standard chow or HFD. Our results support the initial hypothesis, showing that HFD downregulated collagen mRNA levels, while upregulating inflammatory and atrophy pathways and adipogenic transcription factor mRNA levels in the offspring gastrocnemius muscle. It was hypothesized that these two findings combined might contribute to the impaired functional integrity of muscle. On the other hand, we demonstrated that paternal RT increased MMP-2 activity in offspring exposed



to a control diet, accompanied by a decrease in IL-6 levels. More significantly, paternal RT upregulated *P70s6k* and *Ppara* mRNA levels, as well as downregulating *Atrogin1* mRNA levels and decreasing NF $\kappa$ -B, IL-1 $\beta$ , and IL-8 protein levels in offspring exposed to HFD. These data support that paternal RT might modulate key skeletal muscle remodeling pathways and inflammatory profiles in offspring submitted to different diets, which may be relevant for cellular function, longevity, and muscle homeostasis maintenance. Our findings raise valuable insights into the molecular mechanisms involved in the intergenerational impacts of paternal exercise on the musculoskeletal system of offspring. This molecular approach progresses the current knowledge on muscle biology.

Effects of resistance training on gene and protein expression/activity involved in muscle inflammation and remodeling of fathers.

Skeletal muscle is a highly plastic organ that plays a pivotal role in physical maintenance and metabolic health (Blaauw et al., 2013). Strategies focused on increasing the quality of this tissue are relevant, and RT is an effective non-pharmacological tool to promote positive impacts on the remodeling process. However, the regulatory mechanisms that mediate muscle adaptations are complex (Blaauw et al., 2013). The present molecular analysis comparing the TF group vs. SF group (fathers) reinforces that RT might modulate multiple routes involved in muscle remodeling. We observed that RT upregulated anabolic markers (*Igf1*, *Akt*,



*P70sk6*, and *Myod*), *Murf1*, *Cebpa*, *Ppara* mRNA levels, and MMP-2 activity in the gastrocnemius muscle in trained fathers, accompanied by a decrease in IL-8 levels, which may suggest that RT induces molecular adaptation through an integrated signs network. Muscle adaptability is mediated by a complex interplay between a myriad of signaling pathways, joined to several transcription and translation factors (Karakaki et al., 2009; Hoppeler, 2016). The pleiotropic effects of RT and the complexity of responses at a molecular level in our study suggest that there is no singular pathway mediating exercise adaptation. Thus, it is important to emphasize that cellular homeostasis is achieved by a delicate balance between multiple pathways required to carry out complex physiological processes.

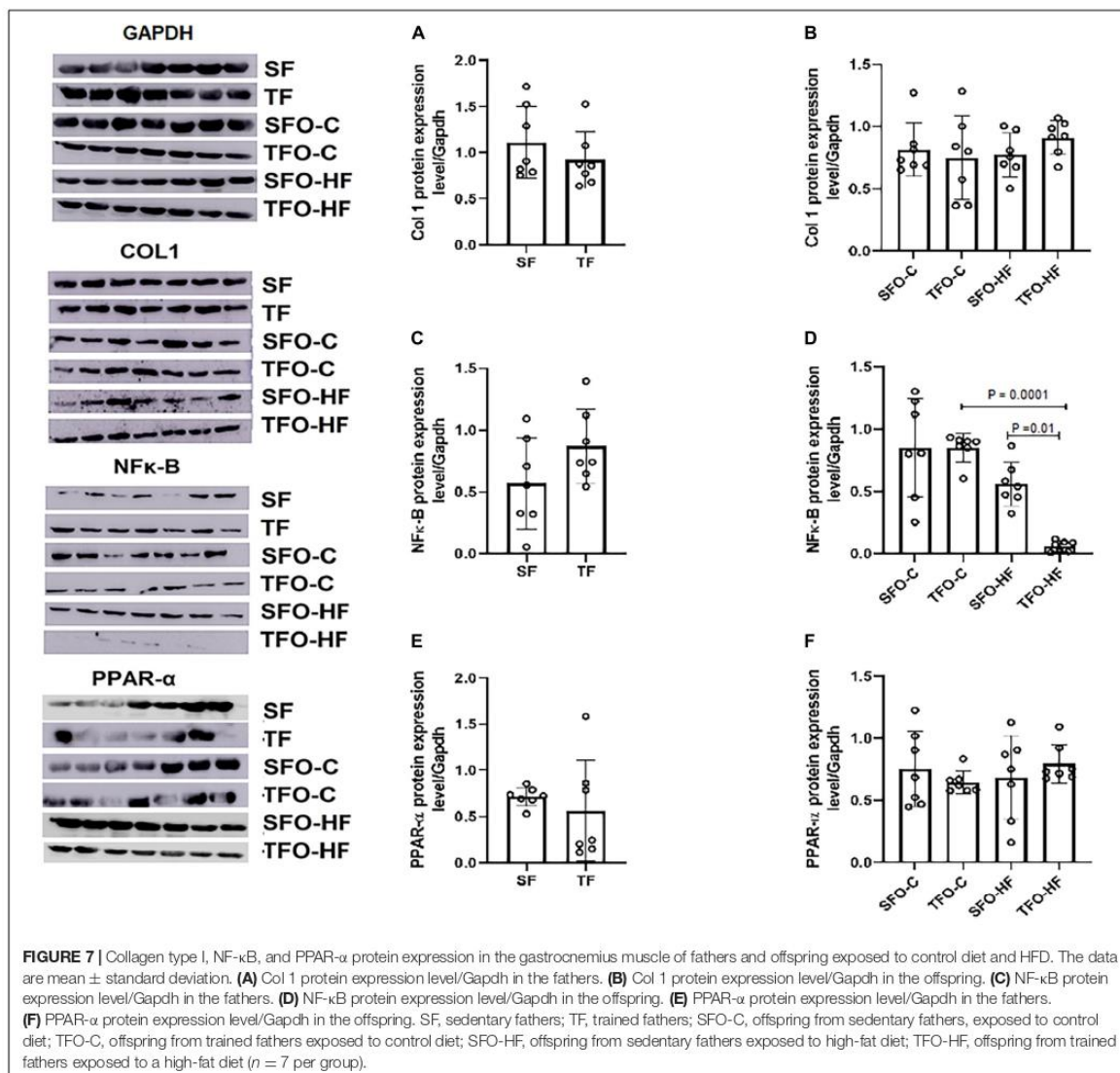
Effects of high-fat diet on gene and protein expression/activity involved in muscle inflammation and remodeling of offspring.

The increase in high-energy dietary and unbalanced calorie intake are well-known risk factors that negatively affect skeletal muscle functionality (Lee et al., 2015; Herrenbruck and Bollinger, 2020). The harmful changes are linked to the increase in intramyocellular lipids, associated with lipotoxicity, ECM dysfunctional remodeling, and changes in muscle atrophy-related genes (Abrigo et al., 2016). Indeed, HFD downregulated collagen mRNA levels while upregulating inflammatory (*Tweak* and *Nfkb*) and atrophy pathways (*Atrogin1* and *Murf1*), and *Cebpa* mRNA levels in the offspring gastrocnemius muscle (SFO-HF vs. SFO-C). This result is in agreement with Kumar et al. (2012), who showed that the *Tweak-Nfkb* axis could be involved in protein breakdown

and play an important role in regulating *Murf1* and *Atrogin1* genes. These changes might result in a more inflammatory and catabolic phenotype linked to the adipogenesis integrated process, leading to a panel of adverse remodeling. Nevertheless, we found that gene expression changes were not reflected at the level of proteins at the time-point analyzed, probably due to delayed synthesis between mRNA or the protein during state transition, as well as proteins disconnected from the transcripts (Liu et al., 2016). It is known that protein levels are regulated by transcriptional regulatory elements such as enhancers and post-transcriptional control mechanisms (Sadhale et al., 2007). Furthermore, protein turnover is often under the control of the ubiquitin-proteasome system. One possibility that should not be ruled out is that NF- $\kappa$ B might be associated with ubiquitin-proteasome system overexpression by HFD diet (Abrigo et al., 2016), which may have affected protein patterns and function in the present study.

Other results confirm that HFD has considerable adverse effects on skeletal muscle remodeling due to down-regulation of *Col3a1* mRNA levels and MMP-2 activity, accompanied by up-regulation of *Nfkb* and *Foxo1* mRNA levels in the offspring from trained fathers (TFO-HF vs. TFO-C). The present findings seem to point to progression toward a degenerative phenotype, typical features of muscle wasting and weakness. Abnormal muscle remodeling may impact cell activity, tissue polarity, and muscle repair, inducing chronic disease initiation or progression. Regarding plausible mechanisms, Abrigo et al. (2016) explained that HFD decreases multipotent mesenchymal stromal cells



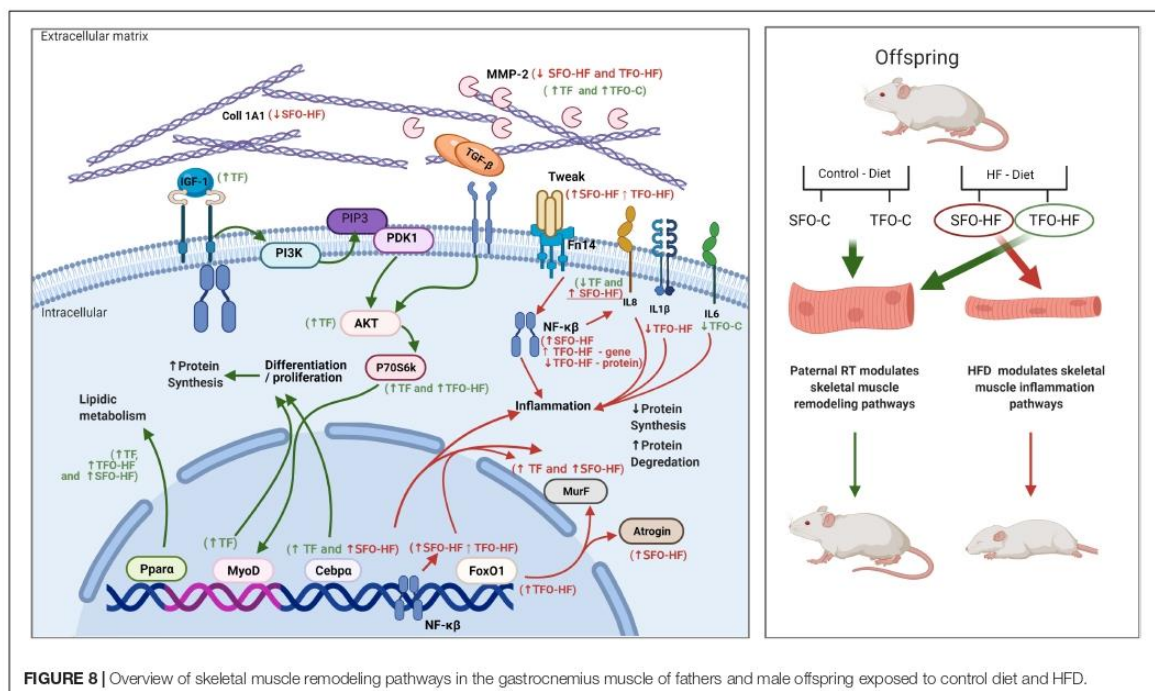


through complex crosstalk of inflammation, oxidative stress, satellite cell dysfunction, and myonuclear apoptosis which, in turn, induces an atrophic effect on skeletal muscle. Furthermore, the adipogenesis process also leads to inflammation and atrophy in muscle cells during obesity (Pellegrinelli et al., 2015), which explains an increase in the *Cebpa*, *Tweak*, and *Nfkb*, *Atrogin1*, and *Murf1* mRNA levels simultaneously in the SFO-HF group.

Effects of paternal resistance training on gene and protein expression/activity involved in muscle inflammation and remodeling of offspring exposed to control diet.

An exciting result was that paternal RT upregulated MMP-2 activity while downregulating *Il6* levels in offspring exposed to the control diet. This suggests that the father's lifestyle

can imply changes in ECM remodeling and the inflammatory profile when offspring are not exposed to a harmful diet. The increase in MMP-2 activity contributes to the remodeling of fibers and connective tissue during normal homeostasis (Chen and Li, 2009). MMP-2 is involved in the morphogenesis and angiogenesis process (de Sousa Neto et al., 2018), playing a critical role in differentiation, muscle repair, and regeneration (de Sousa Neto et al., 2017; Martinez-Huenchullan et al., 2017). Hojman et al. (2019) reported that any ECM alteration initiates the membrane conformational changes needed to release the IL-6-containing intrafibrillar vesicles. Therefore, it seems reasonable to speculate that optimal muscle remodeling modulates inflammation adjustment, considered substantial for



**FIGURE 8 |** Overview of skeletal muscle remodeling pathways in the gastrocnemius muscle of fathers and male offspring exposed to control diet and HFD.

muscle adaptation mechanisms. Additional studies should be carried out to test this hypothesis and clarify the causal link between these two biological phenomena. de Sousa Neto et al. (2020b) reported that paternal RT induces modifications at the protein level in the left ventricle of eutrophic offspring. However, this modulation was more prominent in the tendon when the offspring were subjected to HFD (de Sousa Neto et al., 2020a). Therefore, these results support the idea that molecular responses in the offspring might differ between tissue types.

The results of the present study are in agreement with Lira et al., 2009, who demonstrated the potential exercise effect on downregulation of IL-6 levels in healthy rat skeletal muscle. Regarding possible physiological significance, decreased muscle-derived IL-6 production may work to inhibit the effects of pro-inflammatory cytokines, as well as contributing to glucose homeostasis maintenance and lipid metabolism (Lira et al., 2009; Munoz-Canoves et al., 2013). It is therefore possible to speculate that, as well as the attenuation of HPD-associated chronic inflammation, paternal RT may also lead to a decreased risk of the incidence of various diseases associated with an offspring sedentary lifestyle, considering that even in a eutrophic condition (i.e., TFO-C vs. SFO-C) it shows a significant anti-inflammatory effect.

Effects of paternal resistance training on gene and protein expression/activity involved in muscle inflammation and remodeling of offspring exposed to a high-fat diet.

Another novelty of our study was that paternal RT upregulated *P70s6k*, effective in mitigating the HFD-associated increase in *Atrogin1* mRNA levels in offspring exposed to HFD, which can

inhibit protein degradation and promote synthesis. Possibly, these adaptations are important to alleviate musculoskeletal damage, the inflammatory microenvironment, and nuclear apoptosis (Abrigo et al., 2016). Thus, paternal RT should be considered an important component to combat skeletal muscle atrophy with HFD.

Remarkably, short (3 weeks) and long-term voluntary wheel protocol (12 weeks) proved to be capable of suppressing the effects of a paternal high-fat diet on offspring, reversing impairment in glucose intolerance, fat mass, and glucose uptake in skeletal muscles (Krout et al., 2018; Stanford et al., 2018). This protection occurred through increased expression of insulin signaling pathways (GLUT4, IRS1, and PI3K) in the skeletal muscle of the offspring (Krout et al., 2018). However, voluntary wheel running possibly has a more considerable aerobic component when compared to weighted stair climbing, which can limit the effects on muscle hypertrophy as previously reported (Legerlotz et al., 2008; Kurosaka et al., 2009). Climbing a ladder provides an alternative means of inducing force overload with advantages when improving musculoskeletal properties and neuromuscular function (Hornberger and Farrar, 2004), and consequent signaling pathway activation that controls skeletal muscle hypertrophy. We consider that the current RT protocol (8 weeks, three times per week) should receive special attention since might open new avenues for preventing and treating muscle wasting in metabolic and neuromuscular diseases in offspring exposed to the risk factors.

Curiously, we found that paternal RT upregulated *Foxo1* mRNA levels in the offspring exposed to HFD. Although *Foxo1*

exacerbated activation associated with muscle atrophy, this protein can exhibit ambivalent and pleiotropic functions (Seiler et al., 2013; Sanchez et al., 2014). This suggestion corroborates other studies which showed that *Foxo1* modulates the subcellular localization of the membrane fatty acid translocase that permits fatty acid uptake into muscle cells (Kamei et al., 2003; Bastie et al., 2005). Evidence suggests that *Foxo1* can act as a switch for a shift toward lipids instead of glucose as a fuel substrate under HFD conditions (Constantin-Teodosiu et al., 2012; Sanchez et al., 2014). Additionally, *Ppara* may contribute to adaptive changes in fatty acid metabolism in response to overexpressed *Foxo1* (Constantin-Teodosiu et al., 2012), supporting our TFO-HF group findings. Together, our results suggest that paternal RT can orchestrate factors that might contribute to muscle fat oxidation in the offspring.

In this sense, paternal RT also upregulated *Ppara* mRNA levels, besides decreasing NF- $\kappa$ B and IL-8 protein levels in offspring exposed to HFD, implying a protective factor against the undesired effects of HFD. Upregulated *Ppara* reduces triglyceride levels by increasing lipolysis, contributing to anti-inflammatory activity and metabolic improvements (Gross et al., 2017; Wang et al., 2020). PPAR- $\alpha$  activation interacts with a diverse group of molecules (Viswakarma et al., 2010); for example, PPAR- $\alpha$  inhibits the NF- $\kappa$ B pathway and reduces inflammatory markers, such as IL-1 $\beta$  and IL-8, which in turn suppress atrophy process at multiple levels (Rigamonti et al., 2008). Recently, several plausible studies have revealed that these potent proinflammatory cytokines are involved in calcium homeostasis, mitogenesis, inhibition of angiogenesis, chemotaxis, neutrophil degranulation, and leukocyte activation, which might be an essential contributor to the inflammatory mechanism (Pernhorst et al., 2013; Chuang and Khorram, 2014; Kofanova et al., 2019). Considering our findings, paternal RT may attenuate lipid storage in the skeletal muscle and modulate inflammatory status through IL-1 $\beta$  and IL-8 levels. This result is in agreement with the decrease in *Atrogin1* mRNA levels observed in the TFO-HF group, since it has been demonstrated that IL-1 $\beta$  and IL-8 also play a vital role in atrophy signaling (Callaway et al., 2019). A schematic representation of the intracellular and extracellular environment demonstrates the up and downregulation, and the role of the main genes and proteins identified in this study (Figure 8).

The canonical signaling pathways that induce NF- $\kappa$ B activation converge on the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is responsible for I $\kappa$ B phosphorylation and is essential for subsequent translocation of active NF- $\kappa$ B from the cytoplasm to nucleus (Lawrence, 2009). In addition, Toll like receptor (TLR) stimulation and reactive oxygen species (ROS) inherent to HFD provoke activation of multiple signaling pathways, including I $\kappa$ b/NF- $\kappa$ B axis, JNK/AP-1 signaling, and MAP kinases (ERK1/2, JNK, and p38), promoting subsequent expression of proinflammatory cytokines (Zhang et al., 2016). Alternatively, exercise training decreases TLR expression, while stimulating the expression of antioxidant enzymes and sirtuin 1 (SIRT1), which inhibits NF- $\kappa$ B activity through deacetylation and induces PPAR $\alpha$  signaling pathway activation (Gleeson et al., 2006; Liu and Chang, 2018). Collectedly, these adjacent molecular

pathways and mutual crosstalk could clarify the possible protective paternal RT effects on skeletal muscle inflammation of offspring in the current study.

Paternal RT did not modulate structural matrix proteins or matrix remodeling enzyme mRNA levels, like Col1 protein level and MMP-2 activity in the gastrocnemius muscle of offspring exposed to HFD, which could be related to similar *Ctgf* and *Tgfb* mRNA levels between the TFO-HF and SFO-HF groups. Skeletal muscle ECM is perturbed under insulin-resistant conditions (Kang et al., 2011, 2013; Graae et al., 2019); however we demonstrated that paternal RT did not decrease the area under the curve (AUC) during the oral glucose tolerance test (de Sousa Neto et al., 2020b), which may have contributed to the limited effects of paternal RT on ECM adaptations in the HFD condition.

It has been shown that paternal exercise in advanced aged sires (>P100) suppresses the effects of paternal high-fat diet on offspring, reversing the observed impairment in glucose tolerance, percentage of fat mass, and glucose uptake in different skeletal muscles of the offspring (Stanford et al., 2018). In the current study, adult rats (4-month-old) affect gene and protein expression in the skeletal muscle of offspring, which suggests that different fathers' age might modulate the muscle physiology of offspring. Future studies should include the different species of animals and offspring sex and paternal exercise detraining. Furthermore, the effect of lifelong exercise training, not just for a predetermined time intervention or father's age remains a provocative hypothesis for further investigation. One of the essential aspects of the practical application of this study is to encourage fathers to perform regular exercise throughout life because this might delay the vicious cycle of increased unhealthy risks propagating across generations.

The implementation of paternal RT may become a primary means for combating the ever-growing burden of musculoskeletal system disorders that presently threaten the functional health and wellness of future generations. An epigenetic inheritance mechanistic view could provide crucial clues for public health and clinical practice. Therefore, the tendency or prevalence of muscle abnormalities in the offspring could be partially explained by the father's environment and lifestyle.

## Limitations

Some limitations of the present study should be highlighted, such as the impossibility of analyzing morphology properties (cross-sectional area, intramyocellular lipids, and ECM markers) and muscle functional assessments (strength and isolated whole-muscle contractility). Our results are also limited to our time diet exposure (i.e., 24 weeks) and male offspring. Further research must include female and male offspring in order to identify specific molecular changes or overlaps between the sexes. The reason for this sex-specificity is uncertain and requires further research. The assessment of only a single point in time is also a considerable limitation. Different time-points from the beginning of dietary intake would be highly valuable in order to clarify the time-course effects of other diets on molecular responses. Non-coding RNA and DNA methylation in the sperm are major routes,

which are probably responsible for transmitting the epigenetic landscape from fathers to future generations (Kusuyama et al., 2020; Vieira de Sousa Neto et al., 2021). Additional studies are required to evaluate the link between the sperm epigenetic profile and offspring skeletal muscle remodeling pathways.

## CONCLUSION

In summary, the father's lifestyle and the offspring's diet distinctly modified the key genes and protein expression involved in the muscle inflammation and remodeling pathways. HFD activates inflammatory factors, which in turn might induce dysregulation of signaling pathways associated with the ECM structure and balance between muscle synthesis/breakdown. Interestingly, paternal RT is a critical factor capable of reprogramming different remodeling pathways regardless of the offspring's diet. In particular, MMP-2 and IL-6 for offspring exposed to the control diet, and the synthesis/atrophy pathways, PPAR- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B/cytokine axis for offspring submitted to HFD are relevant candidates modulated by paternal RT that may become potential therapeutic targets for treating skeletal muscle disorders. Of relevance, these critical molecules could be contributing toward a muscle-healthy phenotype in the offspring. We believe our findings provide a significant advance to map key paternal exercise-regulated pathways in offspring skeletal muscle.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The research protocol received approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation from the Universidade Católica de Brasília, Brasília (protocol no. 010/13).

## REFERENCES

- Abrigo, J., Rivera, J. C., Aravena, J., Cabrera, D., Simon, F., Ezquer, F., et al. (2016). High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016:9047821. doi: 10.1155/2016/9047821
- Barin, F. R., de Sousa Neto, I. V., Vieira Ramos, G., Szojka, A., Ruivo, A. L., Anflor, C. T. M., et al. (2019). Calcaneal tendon plasticity following gastrocnemius muscle injury in rat. *Front. Physiol.* 10:1098. doi: 10.3389/fphys.2019.01098
- Bastie, C. C., Nahle, Z., McLoughlin, T., Esser, K., Zhang, W., Unterman, T., et al. (2005). FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280, 14222–14229. doi: 10.1074/jbc.M413625200
- Blaauw, B., Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr. Physiol.* 3, 1645–1687. doi: 10.1002/cphy.c130009
- Bollheimer, L. C., Buettner, R., Pongratz, G., Brunner-Ploss, R., Hecht, C., Banas, M., et al. (2012). Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RS, IN, RT, JP, and RM conceived and planned the design of the experiments. RS, IN, GR, RT, and AC performed the experiments, designed the figures, and analyzed the data. RS, IN, GR, JP, and RM interpreted the results and worked on the writing of the manuscript. JD, GP, ON, OF, CR, FN, and RH involved in planning and supervising the work, also contributed to reagents, materials, and analysis tools, implementation of the research and provided critical feedback of the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

## FUNDING

The authors are grateful for the financial support provided by the Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (grant nos. 193.001.452/2016, 193.000.653/2015, 00193.00000641/2018-45, and 00193.0000168/2019-87) and FAPESP (2013/00798-2 and 2011/11229-3), the Decanato de Pesquisa e Inovação e de Pós-Graduação (grant nos. DPI/DPG N.º 02/2020, DPI/DPG N.º 02/2021, and DPI/DPG N.º 04/2021), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Finance Code 001), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant nos. 445069/2014-7 and 312136/2018-8) from Brazil. ON, JP, JD, and RM were recipients of fellowships for productivity (CNPq). OF was also funded by FAPDF and FUNDECT.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Robin Hambly for reviewing the English.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.706128/full#supplementary-material>

modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology* 13, 609–620. doi: 10.1007/s10522-012-9405-4

Callaway, C. S., Delitto, A. E., Patel, R., Nosacka, R. L., D'Lugos, A. C., Delitto, D., et al. (2019). IL-8 released from human pancreatic cancer and tumor-associated stromal cells signals through a CXCR2-ERK1/2 axis to induce muscle atrophy. *Cancers (Basel)* 11:1863. doi: 10.3390/cancers11121863

Carlsen, H., Haugen, F., Zadelaar, S., Kleemann, R., Kooistra, T., Drevon, C. A., et al. (2009). Diet-induced obesity increases NF-kappaB signaling in reporter mice. *Genes Nutr.* 4, 215–222. doi: 10.1007/s12263-009-0133-6

Chen, X., and Li, Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh. Migr.* 3, 337–341. doi: 10.4161/cam.3.4.9338

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999

Chuang, T. D., and Khorram, O. (2014). miR-200c regulates IL8 expression by targeting IKKB: a potential mediator of inflammation in leiomyoma pathogenesis. *PLoS One* 9:e95370. doi: 10.1371/journal.pone.0095370

- Constantin-Teodosiu, D., Constantin, D., Stephens, F., Laithwaite, D., and Greenhaff, P. L. (2012). The role of FOXO and PPAR transcription factors in diet-mediated inhibition of PDC activation and carbohydrate oxidation during exercise in humans and the role of pharmacological activation of PDC in overriding these changes. *Diabetes* 61, 1017–1024. doi: 10.2337/db11-0799
- de Sousa Neto, I. V., Durigan, J. L. Q., Guzzoni, V., Tibana, R. A., Prestes, J., de Araujo, H. S. S., et al. (2018). Effects of resistance training on matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles and blood circulation during aging. *Front. Physiol.* 9:190. doi: 10.3389/fphys.2018.00190
- de Sousa Neto, I. V., Tibana, R. A., da Cunha Nascimento, D., Vieira, D. C., Durigan, J. L., Pereira, G. B., et al. (2017). Effects of resistance training volume on MMPs in circulation, muscle and adipose tissue. *Int. J. Sports Med.* 38, 307–313. doi: 10.1055/s-0042-123192
- de Sousa Neto, I. V., Tibana, R. A., da Silva, L. G. O., de Lira, E. M., do Prado, G. P. G., de Almeida, J. A., et al. (2020a). Paternal resistance training modulates calcaneal tendon proteome in the offspring exposed to high-fat diet. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:380. doi: 10.3389/fcell.2020.00380
- de Sousa Neto, I. V., Tibana, R. A., Prestes, J., de Oliveira da Silva, L. G., Almeida, J. A., Franco, O. L., et al. (2020b). Paternal resistance training induced modifications in the left ventricle proteome independent of offspring diet. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020:5603580. doi: 10.1155/2020/5603580
- Demasi, M., and Laurindo, F. R. (2012). Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc. Res.* 95, 183–193. doi: 10.1093/cvr/cvs128
- Gleeson, M., McFarlin, B., and Flynn, M. (2006). Exercise and Toll-like receptors. *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 34–53.
- Glover, E. L., and Phillips, S. M. (2010). Resistance exercise and appropriate nutrition to counteract muscle wasting and promote muscle hypertrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 630–634. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833f1ae5
- Goncalves, T. T., Lazaro, C. M., De Mateo, F. G., Campos, M. C., Mezencio, J. G., Claudino, M. A., et al. (2018). Effects of glucosyl-hesperidin and physical training on body weight, plasma lipids, oxidative status and vascular reactivity of rats fed with high-fat diet. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 11, 321–332. doi: 10.2147/DMSO.S153661
- Graae, A. S., Grarup, N., Ribel-Madsen, R., Lystbaek, S. H., Boesgaard, T., Staiger, H., et al. (2019). ADAMTS9 regulates skeletal muscle insulin sensitivity through extracellular matrix alterations. *Diabetes* 68, 502–514. doi: 10.2337/db18-0418
- Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2017). PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 36–49. doi: 10.1038/nrendo.2016.135
- Guedes, J. M., Pieri, B., Luciano, T. F., Marques, S. O., Guglielmo, L. G. A., and Souza, C. T. (2020). Muscular resistance, hypertrophy and strength training equally reduce adiposity, inflammation and insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *Einstein (Sao Paulo)* 18:eAO4784. doi: 10.31744/einstein\_journal/2020AO4784
- Guzzoni, V., Ribeiro, M. B. T., Lopes, G. N., de Cassia Marqueti, R., de Andrade, R. V., Selistre-de-Araujo, H. S., et al. (2018). Effect of resistance training on extracellular matrix adaptations in skeletal muscle of older rats. *Front. Physiol.* 9:374. doi: 10.3389/fphys.2018.00374
- Heinemeier, K. M., Olesen, J. L., Haddad, F., Langberg, H., Kjaer, M., Baldwin, K. M., et al. (2007). Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J. Physiol.* 582(Pt 3), 1303–1316. doi: 10.1113/jphysiol.2007.127639
- Herrenbruck, A. R., and Bollinger, L. M. (2020). Role of skeletal muscle autophagy in high-fat-diet-induced obesity and exercise. *Nutr. Rev.* 78, 56–64. doi: 10.1093/nutrit/nuz044
- Hojman, P., Brolin, C., Norgaard-Christensen, N., Dethlefsen, C., Lauenborg, B., Olsen, C. K., et al. (2019). IL-6 release from muscles during exercise is stimulated by lactate-dependent protease activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 316, E940–E947. doi: 10.1152/ajpendo.00414.2018
- Hoppeler, H. (2016). Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *J. Exp. Biol.* 219(Pt 2), 205–213. doi: 10.1242/jeb.128207
- Hornberger, T. A. Jr., and Farrar, R. P. (2004). Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can. J. Appl. Physiol.* 29, 16–31. doi: 10.1139/h04-002
- Kamei, Y., Mizukami, J., Miura, S., Suzuki, M., Takahashi, N., Kawada, T., et al. (2003). A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 536, 232–236. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00062-0
- Kang, L., Ayala, J. E., Lee-Young, R. S., Zhang, Z., James, F. D., Neuffer, P. D., et al. (2011). Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin alpha2beta1 in mice. *Diabetes* 60, 416–426. doi: 10.2337/db10-1116
- Kang, L., Lantier, L., Kennedy, A., Bonner, J. S., Mayes, W. H., Bracy, D. P., et al. (2013). Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. *Diabetes* 62, 1888–1896. doi: 10.2337/db12-1502
- Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., and Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 23, 779–796.
- Kofanova, O., Bellora, C., Quesada, R. A., Bulla, A., Panadero-Fajardo, S., Keipes, M., et al. (2019). IL8 and EDEM3 gene expression ratio indicates peripheral blood mononuclear cell (PBMC) quality. *J. Immunol. Methods* 465, 13–19. doi: 10.1016/j.jim.2018.11.012
- Krout, D., Roemmich, J. N., Bundy, A., Garcia, R. A., Yan, L., and Claycombe-Larson, K. J. (2018). Paternal exercise protects mouse offspring from high-fat-diet-induced type 2 diabetes risk by increasing skeletal muscle insulin signaling. *J. Nutr. Biochem.* 57, 35–44. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.013
- Kumar, A., Bhatnagar, S., and Paul, P. K. (2012). TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 15, 233–239. doi: 10.1097/MCO.0b013e328351c3fc
- Kurosaka, M., Naito, H., Ogura, Y., Kojima, A., Goto, K., and Katamoto, S. (2009). Effects of voluntary wheel running on satellite cells in the rat plantaris muscle. *J. Sports Sci. Med.* 8, 51–57.
- Kusuyama, J., Alves-Wagner, A. B., Makarewicz, N. S., and Goodyear, L. J. (2020). Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. *Nat. Metab.* 2, 858–872. doi: 10.1038/s42255-020-00274-7
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651
- Lee, S. R., Khamoui, A. V., Jo, E., Park, B. S., Zourdos, M. C., Pantone, L. B., et al. (2015). Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. *Aging Clin. Exp. Res.* 27, 403–411. doi: 10.1007/s40520-015-0316-5
- Legerlotz, K., Elliott, B., Guillemin, B., and Smith, H. K. (2008). Voluntary resistance running wheel activity pattern and skeletal muscle growth in rats. *Exp. Physiol.* 93, 754–762. doi: 10.1113/expphysiol.2007.041244
- Lira, F. S., Koyama, C. H., Yamashita, A. S., Rosa, J. C., Zanchi, N. E., Batista, M. L. Jr., et al. (2009). Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell Biochem. Funct.* 27, 458–461. doi: 10.1002/cbf.1594
- Liu, H. W., and Chang, S. J. (2018). Moderate exercise suppresses NF-κB signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1α axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Front. Physiol.* 9:636. doi: 10.3389/fphys.2018.00636
- Liu, Y., Beyer, A., and Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell* 165, 535–550. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., et al. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr. Metab. (Lond)* 13:15. doi: 10.1186/s12986-016-0074-1
- Marqueti, R. C., Durigan, J. L. Q., Oliveira, A. J. S., Mekaro, M. S., Guzzoni, V., Aro, A. A., et al. (2018). Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling. *FASEB J.* 32, 353–368. doi: 10.1096/fj.201700543R
- Marqueti, R. C., Heinemeier, K. M., Durigan, J. L., de Andrade Perez, S. E., Schjerling, P., Kjaer, M., et al. (2012). Gene expression in distinct regions of rat tendons in response to jump training combined with anabolic androgenic steroid administration. *Eur. J. Appl. Physiol.* 112, 1505–1515. doi: 10.1007/s00421-011-2114-x
- Martinez-Huenchullan, S., McLennan, S. V., Verhoeven, A., Twigg, S. M., and Tam, C. S. (2017). The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. *Obes. Rev.* 18, 776–790. doi: 10.1111/obr.12548
- Messier, C., Whately, K., Liang, J., Du, L., and Puissant, D. (2007). The effects of a high-fat, high-fructose, and combination diet on learning, weight, and glucose regulation in C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 178, 139–145. doi: 10.1016/j.bbr.2006.12.011
- Munoz-Canoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K., and Serrano, A. L. (2013). Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 280, 4131–4148. doi: 10.1111/febs.12338

- National Research Council (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy Press.
- Pellegrinelli, V., Rouault, C., Rodriguez-Cuenca, S., Albert, V., Edom-Vovard, F., Vidal-Puig, A., et al. (2015). Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity. *Diabetes* 64, 3121–3134. doi: 10.2337/db14-0796
- Pernhorst, K., Herms, S., Hoffmann, P., Cichon, S., Schulz, H., Sander, T., et al. (2013). TLR4, ATF-3 and IL8 inflammation mediator expression correlates with seizure frequency in human epileptic brain tissue. *Seizure* 22, 675–678. doi: 10.1016/j.seizure.2013.04.023
- Pothoff, M. J., Olson, E. N., and Bassel-Duby, R. (2007). Skeletal muscle remodeling. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 542–549. doi: 10.1097/BOR.0b013e3282efb761
- Ribeiro, M. B. T., Guzzoni, V., Hord, J. M., Lopes, G. N., Marqueti, R. C., de Andrade, R. V., et al. (2017). Resistance training regulates gene expression of molecules associated with intramyocellular lipids, glucose signaling and fiber size in old rats. *Sci. Rep.* 7:8593. doi: 10.1038/s41598-017-09343-6
- Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1050–1059. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158998
- Sadhale, P., Verma, J., and Naorem, A. (2007). Basal transcription machinery: role in regulation of stress response in eukaryotes. *J. Biosci.* 32, 569–578. doi: 10.1007/s12038-007-0056-6
- Sanchez, A. M., Candau, R. B., and Bernardi, H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 1657–1671. doi: 10.1007/s00018-013-1513-z
- Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2121–2129. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.023
- Seiler, F., Hellberg, J., Lepper, P. M., Kamyschnikow, A., Herr, C., Bischoff, M., et al. (2013). FOXO transcription factors regulate innate immune mechanisms in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 190, 1603–1613. doi: 10.4049/jimmunol.1200596
- Stanford, K. I., Rasmussen, M., Baer, L. A., Lehnig, A. C., Rowland, L. A., White, J. D., et al. (2018). Paternal exercise improves glucose metabolism in adult offspring. *Diabetes* 67, 2530–2540. doi: 10.2337/db18-0667
- Tam, C. S., Power, J. E., Markovic, T. P., Yee, C., Morsch, M., McLennan, S. V., et al. (2015). The effects of high-fat feeding on physical function and skeletal muscle extracellular matrix. *Nutr. Diabetes* 5:e187. doi: 10.1038/nutd.2015.39
- Trajcevski, K. E., O'Neill, H. M., Wang, D. C., Thomas, M. M., Al-Sajee, D., Steinberg, G. R., et al. (2013). Enhanced lipid oxidation and maintenance of muscle insulin sensitivity despite glucose intolerance in a diet-induced obesity mouse model. *PLoS One* 8:e71747. doi: 10.1371/journal.pone.0071747
- Vieira de Sousa Neto, I., Fontes, W., Prestes, J., and de Cassia Marqueti, R. (2021). Impact of paternal exercise on physiological systems in the offspring. *Acta Physiol. (Oxf)* 231:e13620. doi: 10.1111/apha.13620
- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., et al. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated gene expression. *PPAR Res.* 2010:250126. doi: 10.1155/2010/250126
- Wang, Y., Nakajima, T., Gonzalez, F. J., and Tanaka, N. (2020). PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-Null mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21:2061. doi: 10.3390/ijms21062061
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., et al. (2016). ROS and ROS-Mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016:4350965. doi: 10.1155/2016/4350965

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Salomão, Neto, Ramos, Tibana, Durigan, Pereira, Franco, Royer, Neves, Carvalho, Nóbrega, Haddad, Prestes and Marqueti. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.