

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano.

**“EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA E DA
RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO
DIAFRAGMA E DO PARÊNQUIMA PULMONAR DE
RATOS”**

RAFAEL SCHIMITH DA SILVEIRA

2016

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAFAEL SCHIMITH DA SILVEIRA

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA E DA
RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DO
MÚSCULO DIAFRAGMA E DO
PARÊNQUIMA PULMONAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do título de Mestre em Ciências do Movimento Humano.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille

Piracicaba

2016

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito CRB-8/9128

S587e	<p>Silveira, Rafael Schimith da</p> <p>Efeito da desnutrição proteica e da recuperação nutricional nas características morfométricas do músculo diafragma e do parênquima pulmonar de ratos / Rafael Schimith da Silveira. – 2016. 41 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Ozores Polacow Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2016.</p> <p>1. Desnutrição Proteico-Energética. 2. Recuperação Nutricional. 3. Músculos do Sistema Respiratório. 4. Músculo do Diafragma. I. Pertille, Adriana. II. Título.</p> <p>CDU – 613.2.03</p>
-------	---

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA E DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO DIAFRAGMA E DO
PARÊNQUIMA PULMONAR**

RAFAEL SCHIMITH DA SILVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 29 de fevereiro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Dra. Adriana Pertille - UNIMEP
Presidente e Orientadora



Profa. Dra. Rosana Macher Teodori
UNIMEP



Prof. Dr. Gustavo Narvaes Guimarães
FOP/UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Marinês Schimith da Silveira, ao meu pai Telcio L. Nunes da Silveira, aos meus irmãos Karine Schimith da Silveira e Mateus Schimith da Silveira, pois são eles que em todos os momentos da minha vida estão ao meu lado, me incentivando e me apoiando e até mesmo puxando minha orelha para que eu nunca desista dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a Deus por ter me dado animo e coragem nos momentos de fraqueza, e também por me abençoar e me proteger pelas estradas todas durante esse período de estudo.

À minha família que sempre está ao meu lado, em especial a minha mãe, meu pai e meus irmãos, que a todo momento fizeram e fazem de tudo para que eu e meus irmãos possamos estudar e crescer não apenas em tamanho, mas sim psicologicamente para que nada possa embaraçar o nosso caminho.

Também agradeço aos meus amigos da minha cidade Turvo-PR, que mesmo distantes mantiveram-se presentes em minha vida, mantendo conversas, visitas, sorrisos e choros. Agradeço por todo apoio, companheirismo e amizade em todos os momentos da minha vida.

Ao Grupo Escoteiro Acaé da cidade de Turvo-PR por não esquecerem da minha existência e mesmo distante mantivemos contato com os “lobinhos, escoteiros e seniores” e com a chefia, fazendo assim com que crescesse a nossa amizade e o amor fraternal existente com o grupo.

Aos meus amigos, Rodrigo Dias e Jonas José, por além de dividirmos moradia, dividirmos problemas, superar os mesmos, ouvir uns aos outros, pelos momentos de risos, fúria, momentos de puro descuido, mas sempre engraçados.

À minha amiga Circe Sampaio da Costa que por um ano dividiu moradia comigo e sempre soube ouvir e dar bons conselhos, além de me ensinar a não levar a vida tão a sério, que um problema pode ser sim resolvido apenas com um sorriso e que esse sorriso pode transformar não apenas a nossa vida, mas a vida de quem convive conosco.

Às minhas amigas Maura Rigoldi Simões da Rocha e Heleise Oliveira, por terem sido além de colegas de universidade, também amigas e que se fosse pelas sabias palavras no início do programa de mestrado talvez não estivesse presente até o final.

Ao meu amigo Yan Coelho, que hoje posso dizer com toda certeza que é um dos melhores amigos que eu encontrei em Piracicaba e se não fosse pela sua amizade não saberia nem como me locomover na cidade.

Ao meu amigo Vitor Pezolato, pela incrível amizade, pela paciência e pelo companheirismo nesta reta final do programa.

Aos amigos e colegas que conheci nestes anos dentro da Universidade em especial a Elisa Bizzeti Pelai, Daniel Cornelli, Glauber Lopes, Guilherme Campos, Jessica Polleto, Katia Morais, Maisa Cardoso, Sabrina Petrini, Eduardo Ramos e Dayna Noda.

A todos os meus colegas de laboratório, por toda ajuda no desenvolvimento do meu projeto.

Aos professores e funcionários da UNIMEP, quero parabenizá-los por toda paciência que se dirigem aos alunos, pela incrível educação e respeito que recebem dos alunos. Quero agradecer em especial a professora Dra Maria Luiza Ozores Polacow por ter me recebido de braços abertos no início do mestrado e a professora Dra. Rute Estanislava Tolocka por ter me aceito no grupo de estudos NUPEM.

E é claro a minha orientadora Profa. Dra. Adriana Pertille, por toda a paciência que sei que foi enorme, dedicação que sempre teve não apenas comigo, mas com todos os alunos, agradeço também por todas as orientações minuciosas, pelas cobranças, e principalmente por não desistir e fazer eu acreditar no meu projeto, me fazer sentir a sensação de que quero ser um professor igual a ela, um professor nenhum pouco desanimado muito pelo contrário, ensinar brincando.

*Bad dreams, bad dreams go away.
Good dreams, good dreams here to stay.
Arizona Robbins*

RESUMO

A desnutrição proteica afeta vários tecidos e sistemas no corpo humano, influenciando diretamente na estrutura e função dos músculos respiratórios. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da desnutrição proteica e da recuperação nutricional no músculo diafragma e no parênquima pulmonar por meio de técnicas morfométricas. Quinze ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=5): C – grupo controle, recebeu dieta normoproteica 90 dias; D - grupo desnutrido, recebeu dieta hipoproteica 90 dias; DR - grupo desnutrido recuperado com dieta hipoproteica 45 dias e após, dieta normoproteica 45 dias. Após o período experimental os animais foram eutanasiados, o sangue coletado para análise das concentrações plasmáticas de proteína total e albumina. As imagens foram analisadas considerando a área de secção transversa do musculo diafragma e a porcentagem de área do parênquima pulmonar utilizando o programa Image Pró-Plus. Os grupos D e DR apresentaram a massa corporal similar entre a 1ª e a 7ª semana. A partir da 8ª semana, o grupo DR gradativamente apresentou ganho de massa, enquanto que o grupo D manteve o baixo peso ($p < 0,05$). A concentração plasmática da proteína total foi menor nos grupos D e DR e de albumina foi maior no grupo DR ($p < 0,05$). A área de secção transversa das fibras musculares do diafragma nos animais que consumiram a dieta hipoproteica foi estatisticamente menor ($p < 0,05$). Conclui-se que a desnutrição proteica reduziu a massa corporal, a concentração de proteína total e a área de secção transversa do músculo diafragma, entretanto não alterou a concentração de albumina e a área do parênquima pulmonar. A fase de recuperação proposta favoreceu apenas o aumento da área de secção transversa e da concentração de albumina.

Palavras-chave: desnutrição proteica, músculo diafragma, pulmão

ABSTRACT

Protein malnutrition affects many tissues and systems in the human body, directly influencing the structure and function of the respiratory muscles. The objective was to evaluate the effects of protein malnutrition and nutritional recovery in the diaphragm and lung parenchyma by morphometric techniques. Fifteen Wistar rats were randomly divided into three groups (n = 5): C - control group received normal protein diet 90 days; D - malnourished group received diet hypoproteic 90 days; DR - malnourished group recovered with hypoproteic diet 45 days and after, normal protein diet 45 days. After the trial period the animals were euthanized, the blood collected for analysis of plasma concentrations of total and albumin protein. The images were analyzed considering the cross-sectional area of the diaphragm muscle and the percentage of lung parenchymal area using the program Image Pro-Plus. D groups and DR had similar body mass between the 1st and the 7th week. From the 8th week, the DR group gradually introduced mass gain, while the D group maintained low weight ($p < 0.05$). The plasma concentration of total protein was lower in groups D and DR and DR albumin was higher in the group ($p < 0.05$). The cross-sectional area of muscle fibers of the diaphragm for the animals fed the low protein diet was statistically lower ($p < 0.05$). It concludes that protein malnutrition reduced the body weight, total protein concentration and the cross-sectional area of the diaphragm, however did not alter the concentration of albumin and area of the lung parenchyma. The proposed recovery phase favored only increased cross-sectional area and the concentration of albumin.

Keywords: protein malnutrition, diaphragm, lung

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	11
2 - OBJETIVO	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
4 - RESULTADOS	22
5 – DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 - INTRODUÇÃO

A desnutrição é um quadro clínico resultante da ingestão insuficiente de nutrientes específicos que leva a alterações de massa corporal e crescimento corporal podendo assim, trazer déficits significativos em diversos tecidos e sistemas do corpo humano (OISHI et al., 2002; NUNES et al., 2002).

Considera-se a desnutrição um problema de saúde pública, que afeta países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, além de regiões de pobreza em países desenvolvidos, sendo que cerca de 20 milhões de crianças menores de cinco anos sofrem de desnutrição aguda grave (Agência de Saúde das Nações Unidas, 2013).

Frequentemente observa-se que a desnutrição é um problema relevante em países não desenvolvidos, enquanto a obesidade é para os países desenvolvidos. Essa caracterização está um tanto quanto equivocada da realidade a qual nos encontramos atualmente. O número de indivíduos desnutridos nos países em desenvolvimento é elevado, levando em conta, por exemplo, a diferença que separa as altas taxas de obesidade nos Estados Unidos das que são observadas no Canadá ou Inglaterra, ou então a proporção da desnutrição nos países da África Sub-Sahariana se comparado a países da América do Sul (MONDINI; MONTEIRO 1998).

Deste modo, a desnutrição tem relação direta com a pobreza, por ser reflexo das desigualdades socioeconômicas, políticas e da inadequada

distribuição de rendas, tornando difícil o acesso à oferta de alimentos, portanto, é um dos maiores fatores da mortalidade infantil em países em desenvolvimento (MONTE, 2000; NUNES et al., 2002).

A proteína é um nutriente fundamental e dentre suas principais funções estão a formação de enzimas, anticorpos, hormônios, equilíbrio ácido-básico, transporte de oxigênio, coagulação do sangue e atividade muscular (NEIVA; GUERINO; MELLO, 1999).

Também em ambientes hospitalares a desnutrição energético-proteica (DEP) é um problema de saúde pública mundial, atingindo entre 30 a 40% dos pacientes acamados, em consequência da redução da ingestão ou assimilação de energia e/ou proteína. A subsistência deste quadro de má nutrição resulta na diminuição da massa magra, principalmente devido ao catabolismo, o que provoca alterações funcionais nos músculos esqueléticos, elevando os índices de complicações apresentadas por essa população (PEDROLLI; CEREDA; COSTA, 2009; WESTERGREN et al., 2009; SOETERS; SCHOLS, 2009; MCLEAN et al., 2010).

A carência nutricional no período fetal e nos primeiros anos de vida pode resultar em efeitos deletérios durante a maturação dos tecidos (NÓBREGA et al., 1994). Dependendo da duração e intensidade da DEP algumas funções básicas como cognição, consciência, emoção, aprendizado, memória,

motivação e ansiedade, apresentam grandes possibilidades de serem prejudicadas (SILVA; ALMEIDA, 2006).

Alguns autores associam a insuficiência alimentar da criança ao seu crescimento, desenvolvimento e função comportamental ou acadêmica (LUCAS; FEUCHT, 2010; SANTOS; LEMOS; LAMOUNIER, 2010).

A desnutrição proteica imposta no início da vida (desnutrição pós-natal) causa alterações no sistema nervoso central, como aprendizado e memória (FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002), e no sistema nervoso periférico ocorre redução na amplitude e na velocidade do potencial de ação e diminuição da espessura da bainha de mielina (SEGURA et al., 2004), alterações estas que comprometem o desenvolvimento normal de crianças.

Segundo Mahan e Escott-Stump (1998) a desnutrição possui três formas: Marasmo, em que o indivíduo se adapta até certo ponto com o crescimento reduzido, sendo caracterizado por perda muscular e carência de gordura subcutânea; Kwashiorkor que significa “a doença do bebê” e está associada a dietas ricas em carboidratos, das quais a proteína é inadequada ou insuficiente e de baixa qualidade, estando associada à extrema deficiência proteica, levando assim a hipoalbuminemia; normalmente a gordura subcutânea é preservada, mas a diminuição de massa é frequente, porém, mascarada por edema. Na Kwashiorkor marásmico encaixam-se os sintomas

das duas formas citadas anteriormente, porém a perda de gordura subcutânea se torna aparente e agravante.

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, a taxa de letalidade hospitalar das crianças com DEP grave é em torno de 20%, sendo que a situação se torna ainda mais preocupante quando considera-se que pacientes hospitalizados frequentemente apresentam maior deterioração do seu estado nutricional (BRASIL, 2005).

Com a continuidade da má nutrição ocorrerá a diminuição de massa magra, principalmente pelo fato de o catabolismo estar prejudicado, o que leva a alterações funcionais em toda musculatura esquelética, trazendo assim o aumento nas complicações apresentadas pela população (JENSEN et al., 2010).

Nascimento et al. (1990) avaliaram o músculo gastrocnêmio de ratos desnutridos por 30 dias após o desmame, com dieta hipoproteica a 3,2%, e observaram uma importante redução do diâmetro das fibras musculares, principalmente as do tipo II, e aumento dos espaços intercelulares.

De um modo geral, a musculatura esquelética é afetada pela desnutrição, determinando diminuição de mobilidade e maior risco de queda, além de comprometer o tecido ósseo, pois há relatos da relação direta entre desnutrição e osteoporose (INCALZI et al., 2000; BISKEBING, 2002)

A desnutrição também afeta a função e a estrutura dos músculos respiratórios. Segundo Polla et al. (2004), a perda da musculatura respiratória em desnutridos é proporcional a de outros músculos esqueléticos, podendo ser, em alguns casos, até maior. Em consequência disso, pacientes desnutridos, com baixo peso, podem apresentar dispneia, maior grau de aprisionamento de ar (SAHEBJAMI et al., 1993), a capacidade de difusão prejudicada (SAHEBJAMI; SATHIANPITAYAKUL, 2000) e à medida que a perda de peso progride, a falência respiratória se torna comum (FERREIRA, 2003).

Segundo Dias et al. (2004), as modificações no sistema respiratório decorrentes da desnutrição resultam em mudanças na estrutura do parênquima pulmonar, como redução da quantidade de fibras elásticas, presença de edema intersticial e áreas de enfisema, além de comprometer a qualidade do surfactante e o transporte de íons.

Além disso, a desnutrição está também associada com maior suscetibilidade à infecção, principalmente nas vias aéreas superiores e inferiores, pela diminuição da imunidade celular, redução de imunoglobulina, diminuição da função dos macrófagos alveolares e aumento de colonização bacteriana (LEWIS, 1996).

Segundo Ferreira (2003) não está evidente se a desnutrição (com perda de peso) em pacientes com doença pulmonar é consequência da doença ou se é um fator de risco. Estudo retrospectivo epidemiológico observacional encontrou que o risco de desenvolver doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em homens variou inversamente com o índice de massa corpórea (IMC) inicial, mesmo após correção de outros fatores, incluindo tabagismo, idade e obesidade abdominal (HARIK-KHAN; FLEG; WISE, 2002).

O estudo das alterações histológicas dos músculos respiratórios, bem como do parênquima pulmonar em modelos experimentais submetidos à desnutrição proteica e recuperação nutricional torna-se importante, pois permite avaliar a utilização de recursos fisioterapêuticos para melhorar as condições morfofuncionais do músculo diafragma e do tecido pulmonar.

Aventa-se a hipótese de que a recuperação nutricional reverta as alterações morfológicas na estrutura do diafragma e do parênquima pulmonar provocadas pela desnutrição.

2 - OBJETIVO

Avaliar os efeitos da desnutrição proteica e da recuperação nutricional no músculo diafragma e no parênquima pulmonar por meio de técnicas morfométricas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos jovens da linhagem Wistar. Os animais foram adquiridos na Anilab Paulínia/SP com 21 dias de vida (recém-desmamados) e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum* e alocados cinco animais em cada caixa de polietileno de tamanho médio, de acordo com o grupo experimental. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP, sob o protocolo 09/12 (Anexo 1).

Os animais foram distribuídos igual e aleatoriamente em três grupos (n=5), como descrito a seguir:

- Grupo Controle (C) = animais receberam dieta normoproteica (AIN 93M -14% de proteína) por 90 dias, sendo *ad libitum*;
- Grupo Desnutrido (D) = animais receberam dieta hipoproteica (AIN – 6% de proteína) por 90 dias, sendo *ad libitum*;
- Grupo Desnutrido e Recuperado (DR) = animais receberam dieta hipoproteica (AIN – 6% de proteína) por 45 dias e, em seguida, recuperados com dieta normoproteica (AIN 93M – 14% de proteína) por 45 dias, sendo *ad libitum*.

A tabela 1 mostra a composição das dietas preconizada por Reeves, Nielsen e Fahey Jr (1993) e comercializadas por PragSoluções Serviços e Comércio Ltda.

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas pelos grupos experimentais

Ingredientes	Dieta AIN 93M – 14% proteína mg (p/1 Kg)	Dieta AIN (Modificada) – 6% proteína mg (p/1 Kg)
Amido de milho	465.700	508.000
Caseína	140.000	66.000
Amido dextrinizado	155.000	166.500
Sacarose	100.000	121.000
Óleo de soja	40.000	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	50.000
L-cistina	1.800	1.000
Cloreto colina	2.500	2.500
Mix mineral G	35.000	35.000
Mix vitamínico	10.000	10.000
TOTAL	1000.0	1000.0

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey Jr (1993)

A massa corporal foi verificada após o primeiro dia da chegada dos animais ao biotério e repetida a cada sete dias, até o final do experimento, por meio de uma balança digital calibrada (Filizola ®).

Após o período experimental (90 dias), os animais então com 111 dias de vida foram decapitados, sendo as amostras de sangue, pulmão e músculo diafragma coletadas para análise.

O sangue foi centrifugado e as concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina foram determinadas por meio de kit de uso laboratorial (Protototal – Labtest), como descrito por Neiva, Guerino e Mello (1999).

O músculo diafragma foi retirado e fixado em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -196°C . Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70°C . Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23°C , seccionados transversalmente, com espessura de $10\ \mu\text{m}$, utilizando criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss) e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Foram utilizados cinco cortes do músculo diafragma por animal e analisadas três áreas por corte, e em cada área foi mensurada a área de seção transversa (AST) de 15 fibras musculares, totalizando 225 fibras musculares por animal. As imagens foram captadas com a objetiva de 20x por uma câmera digital acoplada a um microscópio integrado a um microcomputador, e analisadas pelo programa Image Pró-Plus 6.2 (Media Cybernetics).

As amostras do pulmão foram fixadas em solução tamponada de formol a 10%, e processadas para inclusão em paraplast®. Cortes transversais não seriados, com $6\ \mu\text{m}$ de espessura foram obtidos por meio de micrótomo (modelo 1512, Leitz Wetzlar) e as lamínas foram coradas com HE.

Para análise da área do parênquima pulmonar (APP) foram selecionados aleatoriamente cinco fragmentos do pulmão por animal, sendo

utilizados cinco cortes por fragmento e cinco áreas por corte, totalizando 125 imagens. As áreas com brônquios, bronquíolos e vasos calibrosos foram excluídas. As imagens foram captadas com a objetiva de 20x por uma câmera digital acoplada a um microscópio integrado a um microcomputador e analisadas pelo programa Image Pró-Plus 6.2 (Media Cybernetics), por meio da planimetria por contagem de pontos de acordo com Mandarin-de-Lacerda, Fernandes-Santos e Aguila (2010). Uma grade com 165 intersecções foi sobreposta sobre a imagem e os pontos que coincidiam com o parênquima pulmonar foram contabilizados, sendo os resultados apresentados em porcentagem.

A análise dos dados foi realizada através do programa GraphPad Software versão 6.0e. Para análise dos dados foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, como foram considerados dados paramétricos foi então utilizado o teste de One Way ANOVA seguido do pós teste de comparação Tukey-Kramer. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

Os animais do grupo C aumentaram gradativamente a massa corporal, atingindo em média 480 gramas ao final do experimento. A partir da primeira semana houve diferença estatisticamente significativa na massa corporal do grupo C quando comparado aos grupos D e DR ($p < 0,05$; Figura 1).

Os grupos D e DR apresentaram a massa corporal similar entre a 1ª e a 7ª semana, não demonstrando nenhum ganho de peso durante o consumo da dieta hipoproteica. A partir da 7ª semana, o grupo DR passou a consumir a dieta normoproteica e, então, apresentou gradativamente aumento da massa corporal, atingindo em média 180 gramas ao final do experimento, sendo estatisticamente menor que o grupo C ($p < 0,05$). Os animais do grupo D consumiram a dieta hipoproteica durante todo o experimento e atingiram em média 75 gramas ao final da 13ª semana, sendo diferente estatisticamente dos grupos C e DR ($p < 0,05$; Figura 1).

Acompanhando a caracterização do status de desnutrição, a concentração plasmática de proteína total apresentou redução de 75% quando comparado o grupo D ao grupo C ($p < 0,05$) e a recuperação nutricional não alterou significativamente este parâmetro. A concentração de albumina não foi alterada com a desnutrição, entretanto com a recuperação nutricional houve aumento significativo dos valores, quando comparado o grupo DR com os grupos C e D ($p < 0,05$; Tabela 2).

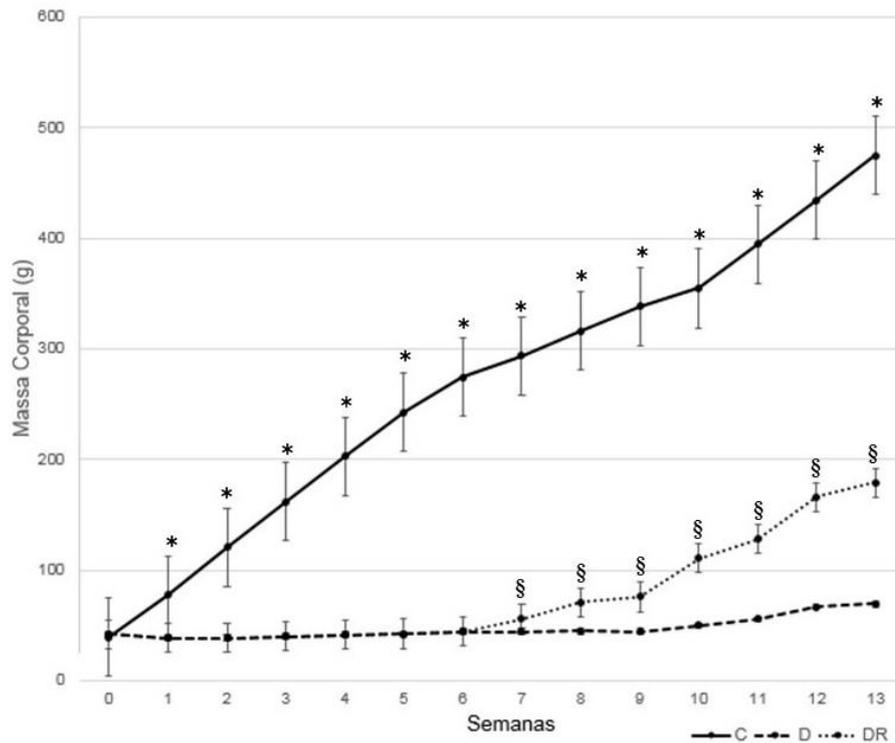


Figura 1. Média e desvio padrão da massa corporal (em gramas) dos grupos durante 90 dias de experimento (13 semanas). C - Controle, D - Desnutrido, DR - Desnutrido Recuperado. * difere dos grupos D e DR ($p < 0,05$); § difere do grupo D ($p < 0,05$)

Tabela 2. Média e desvio padrão da concentração de proteína total e albumina no plasma nos diferentes grupos experimentais; $n=5$.

Grupos Experimentais	Proteína total (g/dL)	Albumina ($\mu\text{mol/L}$)
C	$12,69 \pm 0,9$	$0,35 \pm 0,04^\dagger$
D	$3,16 \pm 0,31^*$	$0,32 \pm 0,31^\dagger$
DR	$5,54 \pm 0,30^*$	$1,88 \pm 0,23$

Legenda: C=Controle ; D=Desnutrido; DR= Desnutrido Recuperado

* Difere de C; † difere de DR; $p < 0,05$

A AST das fibras musculares do diafragma dos animais submetidos à dieta hipoproteica (grupo D e DR) foi estatisticamente menor quando comparada ao grupo C ($p < 0,05$). A recuperação nutricional favoreceu o aumento estatisticamente significativo da AST do grupo DR quando comparado ao D ($p < 0,05$, Tabela 3).

A área do parênquima pulmonar (APP) foi similar entre os grupos C e D, entretanto o grupo DR apresentou aumento significativo da APP ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST) em μm^2 e da área do parênquima pulmonar (APP) em porcentagem nos diferentes grupos; $n=5$

Grupos Experimentais	AST (μm^2)	APP (%)
C	1.340 \pm 526,3	55,7 \pm 7,71
D	541 \pm 390,7 *	48,7 \pm 5,77
DR	967 \pm 484,7 *§	62,5 \pm 3,95 *§

Legenda: C=Controle ; D=Desnutrido; DR= Desnutrido Recuperado

* Difere de C; § difere do D ($p < 0,05$)

Na figura 2 observa-se a característica morfológica das fibras musculares do diafragma (A, C e E), com formato poligonal de diferentes tamanhos, com núcleos periféricos, sem sinais de infiltrado inflamatório. Nas imagens do pulmão (B, D e F), nota-se espessamento do parênquima pulmonar nos grupos D e DR e redução da área alveolar no grupo DR.

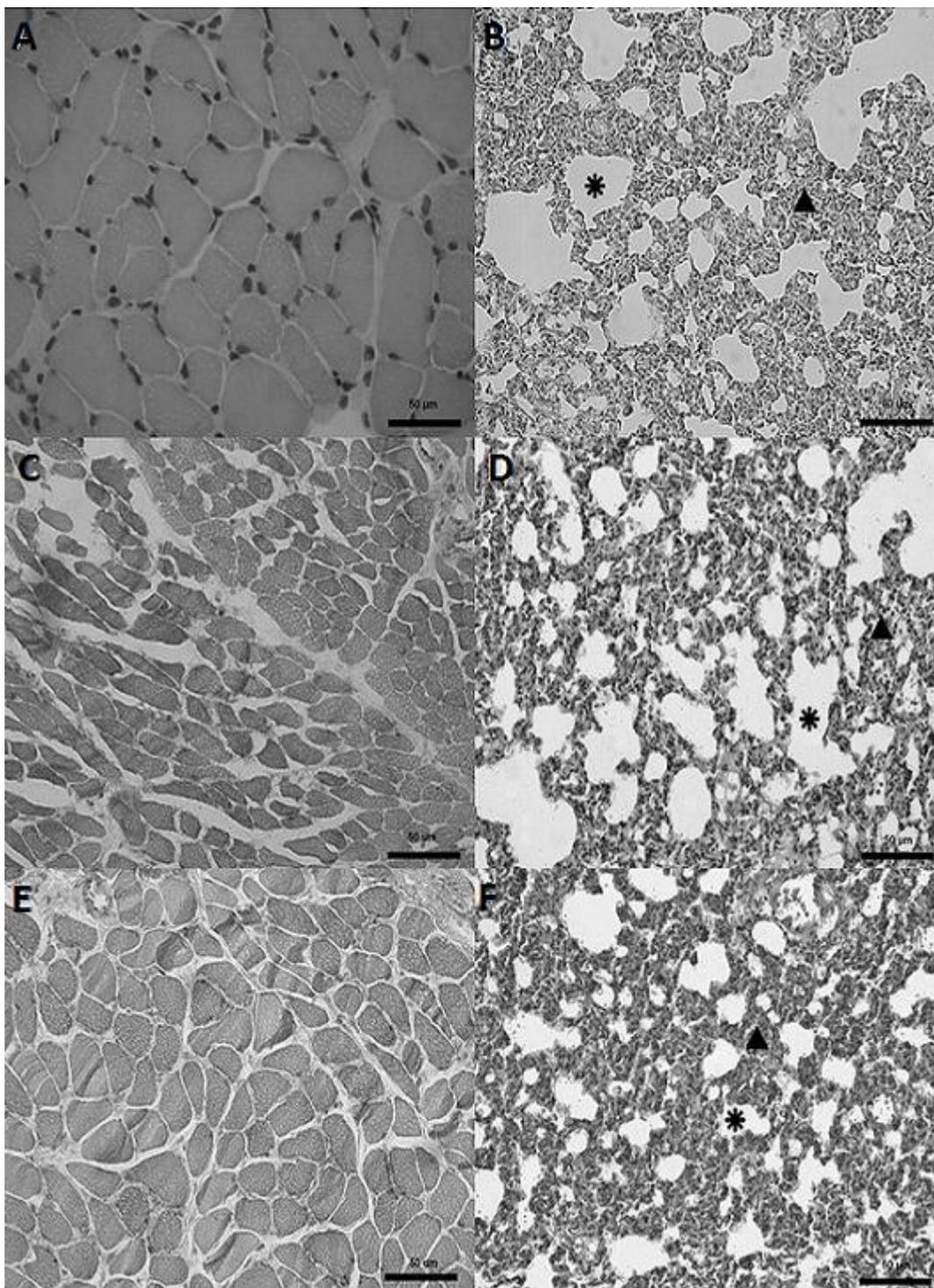


Figura 2 – Cortes transversais no músculo diafragma (A; C; E) e do parênquima pulmonar (B; D; F) nos grupos estudados: Controle (A-B), Desnutrido (C - D), Desnutrido/Recuperado (E - F). Coloração HE. Barra = 50µm
* área alveolar; ▲ parênquima pulmonar.

5 – DISCUSSÃO

O modelo de desnutrição proteica oferecida na fase precoce do desenvolvimento mostrou resultados significativos em relação aos indicadores tanto do crescimento quanto das condições de saúde dos animais. Em relação à massa corporal, os animais desnutridos tiveram menor evolução em relação aos animais controle. Isso tem relação direta com a dieta hipoproteica que não oferece o suprimento ideal de aminoácidos para a formação de hormônios e enzimas que atuam diretamente no desenvolvimento ponderal e de crescimento (NEIVA; GUERINO; MELLO, 1999).

O estudo de Kalenga, Tschanz e Burri (1995) avaliou ratos desnutridos com dieta 8% de caseína por 49 dias, renutridos com dieta 18% de caseína por 77 dias e observou que 10 semanas de recuperação foram suficientes para os animais atingirem o peso corporal do controle. Diferente do presente estudo, onde as dietas apresentam menor porcentagem de caseína (hipoproteica 6% e normoproteica 14%) e o tempo de recuperação foi menor (45 dias), o que não permitiu aos animais recuperados alcançarem os valores da massa corporal do controle.

As proteínas plasmáticas também são marcadoras da desnutrição, uma vez que estão diretamente relacionadas com a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica (REID; CAMPBELL, 2004). Este estudo mostrou que a concentração plasmática de proteína total foi menor no grupo desnutrido. Tais

resultados também foram encontrados nos trabalhos de Papoti et al. (2003) e Melo et al. (2004) que avaliaram animais desnutridos com dieta 6% de proteína por 30 dias e com dieta 8% de proteína por 120 dias, respectivamente.

O estudo de Cabral et al. (2013) avaliou o efeito do treinamento físico no ventrículo esquerdo de ratos desnutridos (6% de caseína) por 8 semanas. Os animais desnutridos (sedentários e treinados) apresentaram redução da massa corporal e da concentração de proteína total.

No grupo DR houve uma tendência ao aumento da concentração plasmática de proteína total, entretanto não foi significativo, o que difere dos achados de Papoti et al. (2003) onde a concentração de proteína total foi similar ao controle após desnutrição com 6% proteína por 30 dias e recuperação nutricional com dieta 17% de proteína por 30 dias.

A albumina é uma importante proteína, que mantém o volume plasmático circulante (DOWEIKO; NOMPLEGGI, 1991) e transporta muitos tipos de substâncias ou hormônios para diferentes órgãos (WHICHER; SPENCE, 1987). Um dos sinais da desnutrição é a redução da concentração de albumina no plasma (TORUN; CHEW, 1994).

Segundo Papoti et al. (2003) ratos alimentados com dieta hipoproteica (6% de caseína) por 30 dias mostraram um quadro semelhante ao da desnutrição infantil do tipo Kwashiorkor, com baixo peso, hipoproteinemia e

hipoalbuminemia. Melo et al. (2004) e Cabral et al. (2013) também observaram redução na concentração de albumina nos animais desnutridos quando comparado ao controle, o que difere do presente estudo, onde as concentrações de albumina foram similares entre os grupos C e D.

Valores semelhantes das concentrações de albumina entre grupos desnutridos e controle foram observados por Leite et al. (2011) que avaliaram ratos submetidos a desnutrição proteico-energética (modelo marasmo) durante os 60 dias de experimento, que pode ser explicado pela diminuição lenta e tardia dos níveis de albumina neste tipo de desnutrição (WALDROP; DOUGHTY, 2004; MECHANICK, 2004).

Após a recuperação nutricional os animais do grupo DR apresentaram aumento significativo da concentração de albumina, que corrobora com os dados do estudo de Papoti et al. (2003), onde os animais foram recuperados por 30 dias com dieta 17% de proteína.

A redução da massa muscular nos animais desnutridos foi evidente na avaliação da área de secção transversa (AST) do músculo diafragma. O grupo D apresentou redução da AST quando comparado aos grupos C e DR.

Na desnutrição o músculo diafragma atrofia tanto quanto o muscles dos membros (LEWIS et al., 1986). O estudo de Hegarty e Kim (1980) demonstrou redução do número e diâmetro de fibras musculares devido a restrição

alimentar, já Lewis et al. (1986) demonstraram redução no tamanho da fibra muscular durante a desnutrição.

No estudo de Oliveira et al. (1999) foi observado o efeito da desnutrição e renutrição no músculo bíceps braquial de recém-nascidos de mães desnutridas. Constatou-se a atrofia seletiva da fibra tipo II (atividade oxidativa baixa), que pode ser explicado na miogênese do músculo, pois as fibras tipo I (lentas) são compostas na sua maioria de fibras musculares provenientes dos miotubos primários, resistentes às influências ambientais; as fibras tipo II (rápidas) tem grande proporção de fibras musculares provenientes dos miotubos secundários, e são suscetíveis aos agravos nutricionais e fatores neurotróficos (WARD; STICKLAND, 1991).

Rosado-Ruiz et al. (2013) sugerem em seu estudo que a subnutrição crônica afeta a maturação das fibras musculares rápidas somente nos animais jovens, e há um provável mecanismo adaptativo nas fibras musculares na fase adulta, contrabalanceando as alterações provocada pela privação alimentar crônica.

O músculo diafragma é formado por 75% de fibras aeróbias (tipo I e IIa) e 25% de fibras anaeróbias (contração rápida, tipo IIb) (JARDIM, 1982). Fibras musculares de pequeno tamanho, grande quantidade de vasos sanguíneos e alta atividade de enzimas oxidativas são características típicas do músculo

diafragma que lhe dão a resistência à fadiga necessária para sua atividade contínua. A perda de massa muscular tem seu maior efeito nas fibras rápidas que reflete nas propriedades contráteis e conseqüente fadiga do músculo diafragma (POLLA et al., 2004).

O grupo DR apresentou aumento da AST quando comparado ao D, entretanto as sete semanas de recuperação não foram suficientes para atingir os valores do controle, o que difere do estudo de Onofre et al. (1988) que analisou o músculo diafragma de coelhos em desnutrição calórica proteica, e observou redução no peso e tamanho das fibras musculares, sendo revertido com a renutrição dos animais.

Sobre a área do parênquima pulmonar, os dados indicam resultado similar entre os grupos controle e desnutrido, sugerindo uma adaptação do tecido pulmonar à condição de desnutrição. O estudo de Barker e Hales (2001) considera o conceito do fenótipo poupador (thrifty phenotype hypothesis), o qual propõe que o animal é capaz de adaptar-se a um ambiente, otimizando o uso de suprimentos enérgicos que estão reduzidos, para garantir a sua sobrevivência, causando assim alterações no crescimento, função dos tecidos e órgãos.

Kalenga, Tschanz e Burri (1995) observaram que a desnutrição por 49 dias com dieta 8% de caseína demonstrou déficit no crescimento do pulmão,

mas não refletiu nos valores relativos da morfometria parenquimatosa, como relatado no presente estudo na comparação entre os animais controle e desnutridos.

Entretanto, o grupo recuperado (DR) apresentou aumento no parênquima pulmonar. O estudo de Santos, Silva e Polacow (2013) utilizou bleomicina (droga antineoplásica) para provocar uma reação inflamatória e fibrose pulmonar em ratos Wistar. O grupo controle apresentou 51,3% de área de densidade alveolar e o grupo bleomicina 31,6%. Resultado similar foi observado no presente estudo onde o grupo DR apresentou 64% de área de parênquima pulmonar (36% de área de densidade alveolar), sugestivo de um processo inflamatório, indicando que a recuperação nutricional não influenciou o tecido pulmonar.

Ferreira et al. (2000) consideram que a desnutrição diminui o desempenho respiratório, pela depleção das proteínas musculares. Tal fato pode aumentar a suscetibilidade do indivíduo à infecções pulmonares (FERNANDES; BEZERRA, 2006).

Os resultados do presente estudo indicam que a dieta de baixa proteína não forneceu aminoácidos suficientes para desenvolvimento corporal ideal dos animais desnutridos, uma vez que os aminoácidos são compostos essenciais para a síntese de proteínas, desenvolvimento muscular e metabolismo.

As sete semanas propostas neste estudo para recuperação da desnutrição não se mostraram suficientes para reverter alguns parâmetros, como a redução da massa corporal e concentração de proteína total. Vale ressaltar que os animais em condições de biotério são susceptíveis a inflamação do trato respiratório, o que pode ter interferido nos resultados da área de parênquima pulmonar do grupo DR.

A hipótese do presente estudo foi parcialmente confirmada, pois a desnutrição não interferiu na área do parênquima pulmonar e a recuperação nutricional reverteu apenas a AST do músculo diafragma e aumentou a concentração de albumina.

Em relação às limitações do estudo, destaca-se o não controle a ingestão alimentar, a ausência da análise de um marcador inflamatório, a ausência da análise dos parâmetros ventilatórios e um grupo com maior tempo de recuperação nutricional. Estudos futuros devem considerar tais análises e condições controladas de ambiente para este modelo experimental.

6. CONCLUSÃO

A desnutrição proteica reduziu a massa corporal, a concentração de proteína total e a área de secção transversa do músculo diafragma, entretanto não alterou a concentração de albumina e a área do parênquima pulmonar, sugerindo uma forma de adaptação do organismo a situação de desnutrição.

A fase de recuperação proposta favoreceu apenas o aumento da área de secção transversa e da concentração de albumina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DE SAÚDE DAS NAÇÕES UNIDAS, 2013. Disponível em: <www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=46608&Cr=Malnutrition&Cr1=#.Utl eutJTtki> acesso em 16/01/2014.

HALES, C. Nicholas; BARKER, David JP. The thrifty phenotype hypothesis. **British medical bulletin**, v. 60, n. 1, p. 5-20, 2001.

BISKEBING, D.M. COPD and osteoporosis. **Chest**, v.121, p.609-620, 2002

BRASIL; MINISTERIO DA SAUDE. Secretaria de Atenção a Saúde. **Manual de Atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar**. Normas e manuais técnicos. Brasília DF, 2005, p. 144

CABRAL, C. A. C.; NATALI, A. J.; NOVAES, R. D.; et al. Protein Restriction Does not Impair Adaptations Induced in Cardiomyocytes by Exercise in Rats. **Inter J Sports Medicine**, v.34, n.11, p.1015-1019, 2013.

DIAS, C.M.; PÁSSARO, C.P.; CAGIDO, V.R.; EINICKER-LAMAS, M.; LOWE, J.; NEGRI, E.M. Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. **J Appl Physiol**, v.97, p.1888-1896, 2004.

DOWEIKO, J.P.; NOMPLEGGI, D.J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **JPEN**, v.15, n.2, p.207-11, 1991.

FERREIRA, I.M.; BROOKS, D.; LAÇASSE, Y.; GOLDSTEIN, R.S. Nutrition support for individuals with COPD: a meta-analysis. **Chest**, v.117, n.3, p. 672-8, 2000.

FERREIRA, I.M. Doença pulmonar crônica e desnutrição: porque não estamos vencendo a batalha? **J Pneumol**, v.29,n.2, p.107-115, 2003.

FERNANDES, A.C.; BEZERRA, O.M.P.A. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. **J Bras Pneumol**, v.32, n.5, p.461-71, 2006.

FUKUDA, M.T.H.; FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; ALMEIDA, SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behav Brain Res**, v.133, p. 271-277, 2002.

HARIK-KHAN, R.I.; FLEG, J.L.; WISE, R.A. Body mass index and the risk of COPD. **Chest** , v.121, p.370-376, 2002

HEGARTY, P.V.; KIM, K.O. Changes in skeletal muscles cellularity in starved and refeed young rats. **Br J Nutr**, v.44, p.123-7, 1980.

INCALZI, R.A.; CAZADONNA, P.; RANIERI, P.; BASSO, S.; FUSO, L.; PAGANO, F. *et al.* Correlates of osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. **Respir Med**. v.94. p.1079-84, 2000

JARDIM, J.R.B. Fisiologia pulmonar – ação dos músculos respiratórios. **J Pneumol**, v.8, n.2, p.118-124, 1982.

JENSEN, G.L.; MIRTALLO, J.; COMPHER, C.; DHALIWAL,R.; FORBES,A.;GRIJALBA, R.F. *et al.* Adult starvation and disease-related malnutrition: A proposal for etiology-based diagnosis in the clinical practice setting from the International Consensus Guideline Committee. **Clin Nutr**, v.29, n.2, p.151-153, 2010.

KALENGA, M.; TSCHANZ, S.A.; BURRI, P.H. Protein deficiency and the growing rat lung. II. Morphometric analysis. **Pediatric Research**, v.37, n.6, p.789-795,1995.

LEITE, S. N.; JÚNIOR, J.; AFONSO, A.; et al. Modelos experimentais de desnutrição e sua influência no trofismo cutâneo. **An. Bras. Dermatol**, v.86, n.4,p. 681-688, 2011.

LEWIS, M.I. Nutrition and chronic obstructive disease: a clinical overview. In BACH, J.R, editor. **Pulmonary rehabilitation: the obstructive and paralytic condition**. Philadelphia, P.A: Henley & Belfus/Mosby, 1996, p. 157-71.

LEWIS, M.I.; LORUSSO, T.J.; ZHAN, W.Z.; et al. Interactive effects of denervation and malnutrition on diaphragm structure and function. **J Appl Physiol**, v.81, p.2165-72, 1996.

LUCAS, B. L.; FEUCHT, S. A. Nutrição na infância. In: MAHAN, L. K.; ESCOTTSTUMP, S. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap.7. p. 222 – 2237.

MAHAN L. K. & ESCOTT-STUMP S. KRAUSE - **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998: 62-63 6. Shils.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M.B. Image analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA (Editors), **Histology protocols: methods in molecular biology**. New Jersey: Humana Press 2010, p. 211-225.

MECHANICK, J.I. Practical aspects of nutrition for wound healing patients. **Am J Surg.**, v.188, p.52-6, 2004.

MELLO, S.T.M.; LIBERTI, E.A.; GONCALVES, D.M.; et al. Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo B. **Acta Scient Biol Sci**, v.26, n.2, p.251-256, 2004.

MONDINI L; MONTEIRO A. C. Relevância epidemiológica da desnutrição e da obesidade em distintas classes sociais: métodos de estudo e aplicação à população brasileira. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 1, n. 1, p.14-19, 1998.

MONTE, C.M.G. Atendimento à criança desnutrida em ambulatório e comunidade. Temas de Nutrição em Pediatria, [S.l.]: **Departamento Científico de Nutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria**, v. 2, p. 13-23, 2000.

NASCIMENTO, O.J.; MADI, K.; SILVA, J.B.G.; SOARES FILHO, P.J.; HAHN, M.D.; COUTO, B. *et al.* Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição proteica. **Arq neuro-psiquiat** v. 48. n.4, p.395-402, 1990.

NEIVA, C.M.; GUERINO, M.R.; MELLO, M.A.R. Análise dos efeitos da desnutrição protéico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single section) parâmetros metabólicos. **Motriz**, v.1,n.1, p.32-43, 1999.

NÓBREGA, Fernando José de et al. Crianças desnutridas internadas: relação com variáveis maternas. **Rev. paul. pediatr**, v. 12, n. 3, p. 286-90, 1994.

NUNES, M.L.; BATISTA, B.B.; MICHELI, F.; BATISTELA, V. Effects of early malnutrition and nutrition rehabilitation in rats. **J. Pediat.**, v.77, p.39-44, 2002.

OISHI, Y.; ZHENGWEI, F.; OHNUKI, Y.; KATO, H.; NOGUCHI, T. Effects of protein deprivation on $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen and its degrading system in rat skin. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.66, p.117-126, 2002.

OLIVEIRA, F.L.C.; OLIVEIRA, A.S.B.; SCHIMIDT, B.; AMANCIO, O.M.S. Intrauterine energy malnutrition in rats: muscle skeletal changes in the 1st and 2nd generations. **J. Pediatr**, v.75, n.5, p.350-6, 1999.

ONOFRE, A. F. D.; FREIRE, E. C. D. S.; MAIA, F.; et al. Efeitos da desnutrição aguda sobre o diafragma: Estudo experimental em coelhos. **Rev. Col. Bras. Cir**, v.15, n.6, p.353-7, 1988.

PAPOTI, M.; ALMEIDA, P.B.L.; PRADA, F.J.A.; et al. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz**, v.9, n.2, p.103-10, 2003.

PEDROLLI, C.; CEREDA, E.; COSTA, A. Fighting hospital malnutrition: let's start by calibrating hospital scales! **Mediterr J Nutr Metab** v.2, p.145-147, 2009

POLLA, B.; D'ANTONA, G.; BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. **Thorax**, v.59, p.808-817, 2004.

REID, C.L.; CAMPBELL, I.T. Metabolic Physiology. **Curr Anaesth Crit Care**, v.15, n.3, p.209-17, 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

ROSADO-RUIZ, A.; FERNANDEZ-VALVERDE, F.; TOVAR-MARISCAL, S.; et al. Histoenzymatic and Morphometric Analysis of Muscle Fiber Type Transformation during the Postnatal Development of the Chronically Food-Deprived Rat. **J Histochem Cytochem**, v.61, n.5, p.372-381, 2013.

SAHEBJAMI, H.; DOERS, J.T.; RENDER, M.L.; BOND, T.L. Anthropometric and pulmonary function test profiles of outpatients with stable chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Med**, v. 94, p.469-74, 1993.

SAHEBJAMI, H.; SATHIANPITAYAKUL E. Influence of body weight on the severity of dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161, p.886-890, 2000.

SANTOS N.J.; LEMOS A.M.S.; LAMOUNIER A.J.; Estado nutricional e desenvolvimento da linguagem em crianças de uma creche pública. **Rev Soc**

Bras Fonoaudiol. v.15, n.4, p.566-71, 2010.

SANTOS, L.A.; SILVA, C.A.; POLACOW, M.L.O. Effect of early treatment with transcutaneous electrical diaphragmatic stimulation (TEDS) on pulmonary inflammation induced by bleomycin. **Braz J Phys Ther**, v.17, n.6, p.606-613, 2013.

SEGURA, B. et al. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. **Neuroscience letters**, v. 354, n. 3, p. 181-184, 2004.

SILVA, V.C.; ALMEIDA, S.S. Desnutrição protéica no início da vida prejudica memória social em ratos. **Rev Nut**, v.19, n.2, p.195-201, 2006.

SOETERS, P.B.; SCHOLS, A.M.W.J. Advances in understanding and assessing malnutrition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.12. p.487-94, 2009.

TORUN, B., CHEW, F. Protein-energy malnutrition. In: **Nutrition in Health and Disease**, Shils, M.; Olson, J.A.; Shike, M. (eds) Modern, v.2, Philadelphia, Lea and Febiger. 1994. p. 950-976.

WALDROP, J.; DOUGHTY, D. Wound healing physiology. In: BARANOSKI, S.; AYELLO, E.A. **Wound Care Essentials**. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 17-27.

WARD, S.S.; STICKLAND, N.C. Why are the slow fast muscle differentially affected during prenatal undernutrition? **Muscle Nerve**, v.14, p.259-67,1991.

WESTERGREN, A.; WANN-HANSSON,C.; BÖRGDAL, E.B.; SJOLANDER,J.; STRÖMBLAD, R.; KLEVSGARD,R. *et al.* Malnutrition prevalence and precision in nutritional care differed in relation to hospital volume - a cross-sectional survey. **Nutr J**, v.8, p.8-20, 2009.

WHICHER J, SPENCE C. When is serum albumin worth measuring? **Ann Clin Biochem**, v. 24, p.572-80,1987.

ANEXO

CEUA – UNIMEP- Piracicaba

Ref. Parecer 09/2012

O projeto avaliado engloba a análise de fundo bioquímico e/ou morfológico em diferentes ações experimentais tal como na imobilização, desnervação, treinamento físico ou estudo da ação de fármacos sendo direcionado a ratos tratados com dieta normoproteica, desnutridos (tratados com dieta hipoproteica) ou recuperados do ponto de vista nutricional.

Sendo aprovado pela CEUA na reunião de 04 de setembro de 2012.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Alberto da Silva'.

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente da CEUA – UNIMEP - Piracicaba