

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO  
MOVIMENTO HUMANO

Regeneração muscular em modelo experimental de recuperação  
nutricional: análise morfológica e bioquímica

Kizzy Ferreira Moura

2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KIZZY FERREIRA MOURA

Regeneração muscular em modelo experimental  
de recuperação nutricional: análise morfológica  
e bioquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Ciências do Movimento Humano, Área de concentração: Biodinâmica, Linha de pesquisa: Avaliação e Reabilitação Funcional.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Pertille

PIRACICABA  
2015

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

M929r	<p>Moura, Kizzy Ferreira Regeneração muscular em modelo experimental de recuperação nutricional: análise morfológica e bioquímica / Kizzy Ferreira Moura. – 2015. 46 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Adriana Pertille. Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciência do Movimento Humano, 2015.</p> <p>1. Desnutrição. 2. Fenômenos biológicos. I. Moura, Kizzy Ferreira. II. Título.</p> <p>CDU – 615.8</p>
-------	--

Dedico este trabalho a minha família:  
Aos meus pais, seu Zé e dona Lucimara,  
A minha irmã Janaína,  
Aos meus sobrinhos Valter, Ynaê e Fran,  
Ao meu anjo da guarda Douglas,  
Em especial a minha vó, dona Lydia.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS por me iluminar, guiar meu caminho e tornar esse trabalho possível, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, José Carlos Moura e Lucimara M. F. da S. Moura, pelo esforço, dedicação, pelos ensinamentos, princípios, e por me mostrarem o valor dos estudos.

A minha irmã Janaína C.F. Moura por suas orações, aos meus sobrinhos Valter José, Ynaê Clara e Francesca Giovana pela paciência com sua tia nos períodos mais críticos.

Ao Douglas Campolim Miranda, meu noivo, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, conselhos, sempre me incentivando, dando forças e me tranquilizando.

A minha vó Lydia que muito queria que este sonho se realizasse, as minha tias Edith e Zilda que também me ajudaram para que esse sonho fosse possível.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Pertille pela paciência, dedicação e incentivo na orientação, pelos ensinamentos e conselhos não apenas para esta pesquisa, mas para toda a minha vida acadêmica.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Alberto Silva pelos ensinamentos, conversas, conselhos e orientação.

Aos amigos de laboratório e companheiros de mestrado, Ana Cláudia, Douglas, Luana e Paulo pelo apoio durante a pesquisa, os experimentos e por fazerem dos laboratórios ambientes sempre divertidos.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que  
as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia  
impossível.”*  
*Charles Chaplin*

## RESUMO

A desnutrição nos primeiros anos de vida, refletida por indicadores antropométricos do estado nutricional, é um dos maiores problemas de saúde enfrentado por países em desenvolvimento. O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição proteica por ser um reservatório de proteína no organismo. Quando há déficit proteico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção, ocasionando alterações nas fases de crescimento e diferenciação das fibras musculares. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo analisar a evolução da regeneração muscular após criolesão no músculo tibial anterior de ratos jovens desnutridos e recuperados. Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, divididos em 2 grupos: Nutrido (N, n=20), receberam dieta normoproteica (14% de proteína) por 90 dias; e o Desnutrido Recuperado (DR, n=20), submetidos a duas fases nutricionais, correspondendo a 45 dias de desnutrição com dieta hipoproteica (6% proteína), seguida por 45 dias de dieta normoproteica (14% proteína). Ao completar a fase de recuperação, todos os animais foram submetidos à criolesão no músculo tibial anterior direito e posteriormente divididos aleatoriamente em 6 subgrupos (n=5), para melhor avaliação da resposta tecidual: Grupo Nutrido Lesado (NL) 7, 14 e 21 dias; e Grupo Desnutrido Recuperado Lesado (DRL) 7, 14 e 21 dias. Para análise morfológica foram utilizados apenas os animais 14 dias (NL, n=5; DRL, n=5) e para análise bioquímica foram utilizados todos os tempos (NL, n=15; DRL, n=15). O músculo tibial anterior foi retirado para análise da área de secção transversa (AST), quantificação de tecido conjuntivo (TC), área de inflamação/regeneração (microscopia de luz) e verificação do conteúdo das proteínas MyoD e Miogenina e da citocina TGF- $\beta$ 1 (immunoblotting). A avaliação dos dados foi realizada através do programa Bioestat. Para comparação entre os grupos nos diferentes tempos foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) one way, seguido de Tukey-Kramer. Para outras análises foi utilizado o teste *t Student*. Em todos os casos foi adotado um valor de  $p < 0,05$  para significância estatística. O grupo DR apresentou menor massa corporal e menor consumo alimentar no processo de desnutrição, quando comparado ao grupo nutrido ( $p < 0,05$ ). A quantidade de tecido conjuntivo e a área de inflamação 14 dias pós-lesão foi maior no grupo Desnutrido Recuperado Lesado (DRL) ( $p < 0,05$ ). A AST das fibras regeneradas do grupo DRL foram menores quando comparadas às fibras normais (controle) do mesmo grupo, sendo esta redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). No grupo Nutrido Lesado (NL), as fibras regeneradas pós-lesão atingiram 88% do seu controle, não sendo observada diferença estatística significativa. Na comparação entre os grupos (DRL e NL) nota-se que a AST foi menor no grupo DRL ( $p < 0,05$ ). O conteúdo das proteínas MyoD e Miogenina foi maior no grupo NL. A citocina TGF- $\beta$ 1 não apresentou diferença entre os grupos. Conclui-se que o protocolo proposto de desnutrição pós desmame e recuperação nutricional por dois meses foi eficaz para demonstrar alterações no processo de regeneração do músculo tibial anterior de ratos jovens. Observou-se atraso no reparo muscular, com aumento da área de inflamação e porcentagem de tecido conjuntivo, redução da área de secção transversa das fibras musculares, redução do conteúdo de MyoD e miogenina. O conteúdo de TGF- $\beta$ 1 não foi alterado com a restrição alimentar.

**PALAVRAS-CHAVE:** músculo esquelético, desnutrição proteica, lesão, fatores de regulação miogênica

## ABSTRACT

Malnutrition early in life, as measured by anthropometric indicators of nutritional status, is one of the biggest health problems faced by developing countries. Skeletal muscle tissue is sensitive to protein malnutrition because it is a protein reservoir of the body. When there is a deficit in protein diet, this tissue becomes depleted target, causing changes in the phases of growth and differentiation of muscle fibers. Therefore, this study aimed to analyze the evolution of muscle regeneration after cryoinjury the tibialis anterior muscle of rats undernourished and recovered youth. 40 Wistar rats were divided into 2 groups were used: Nourished (N, n = 20) received normal protein diet (14% protein) for 90 days; Malnourished and Recovered (DR, n = 20), submitted to two nutritional stages, corresponding to 45 days of malnutrition with hypoproteic diet (6% protein), followed by 45 days of normal protein diet (14% protein). To complete the recovery phase, all animals underwent cryoinjury the tibialis anterior muscle right and randomly divided into 6 subgroups (n = 5), to better assess the tissue response: Nourished Group injured (NL) 7, 14 and 21 days; Malnourished and Group Re injured (DRL) 7, 14 and 21 days. For morphological analysis the animals were used only 14 days (NL, n = 5; DRL, n = 5) and were used for biochemical analysis all times (NL n = 15; DRL, n = 15). The tibialis anterior muscle was removed for analysis of cross-sectional area (CSA), quantification of connective tissue (CT) area of inflammation / regeneration (light microscopy) and verifying the content of MyoD and Myogenin proteins and TGF- $\beta$ 1 cytokine (immunoblotting). The evaluation of the data was performed using the Bioestat program. For comparison between groups in different times we applied the analysis of variance (ANOVA) one way, followed by Tukey-Kramer. For further analysis we used the Student t test. In all cases it adopted a value of  $p < 0.05$  for statistical significance. The DR group had lower body mass and lower food consumption in malnutrition process, when compared to the large group ( $p < 0.05$ ). The amount of connective tissue and inflammation area 14 days post-injury was greater in the damaged malnourished group Re (DRL) ( $p < 0.05$ ). AST of the regenerated fibers of the DRL group were lower when compared to standard fibers (control) the same group, a statistically significant reduction ( $p < 0.05$ ). Nourished on the injured (NL) group, the post-injury regenerated fibers reached 88% of its control, not being statistically significant difference. Comparing the groups (DRL and NL) note that AST was lower in the group DRL ( $p < 0.05$ ). The content of MyoD and Myogenin protein was higher in the NL group. The TGF- $\beta$ 1 cytokine did not differ between groups. It follows that the proposed protocol post weaning undernutrition and nutritional recovery for two months was effective for changes in the regeneration process of the tibialis anterior muscle in young rats. Delay was observed in muscle repair, with increased inflammation area and percentage of connective tissue, reduced cross-sectional area of muscle fibers, reducing the content of MyoD and myogenin. Content TGF-  $\beta$ 1 did not change with dietary restriction.

Key words: skeletal muscle, protein malnutrition, injury, myogenic regulatory factors

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	09
2. Objetivos .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivo Específico .....	15
3. Material e Métodos .....	16
3.1 Nutrição .....	16
3.2 Grupos Experimentais .....	17
3.3 Procedimentos da Lesão Muscular .....	18
3.4 Eutanásia dos Animais .....	19
3.5 Análise Histológica .....	19
3.5.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) .....	19
3.5.2 Coloração por Tricrômico de Masson .....	20
3.6 Técnica de Immunoblotting .....	20
3.6.1 Preparação de Extrato Total .....	20
3.6.2 Eletroforese .....	21
3.6.3 Anticorpos .....	22
3.7 Análise dos Resultados .....	22
3.7.1 Quantificação da área de regeneração e TC.....	22
3.7.2 Análise das bandas imunorreativas .....	23
3.8 Análise dos Dados .....	24
4. Resultados.....	25
5. Discussão .....	32
6. Conclusão .....	39
Referências Bibliográficas .....	40
Anexo .....	46



## 1. Introdução

A desnutrição é um desequilíbrio nutricional que ocorre em indivíduos que se alimentam de forma incorreta, sendo definida por Ge e Chang (2001), como o estado patológico proveniente da ingestão insuficiente de calorias, proteínas, vitaminas, minerais e outros nutrientes. Além disso, segundo Morgane, Mokler e Galler (2002) a desnutrição também pode ser ocasionada pela baixa qualidade dos alimentos ingeridos.

O número de indivíduos desnutridos nos países em desenvolvimento é elevado, sendo motivo de preocupação para os órgãos competentes e do desenvolvimento de estudos científicos, na tentativa de minimizar essa calamidade que aflige a humanidade. Em populações menos favorecidas economicamente, o índice desnutricional atinge 76,1 % , sendo maior do que a média da população nacional urbana, segundo o Ministério do Desenvolvimento Social (BRASIL, 2007).

Na infância a desnutrição é indicada pelo grave comprometimento do crescimento linear ou pelo emagrecimento exagerado da criança. Estatisticamente, afirma-se que 38,1% das crianças menores de cinco anos que vivem em países em desenvolvimento estejam com o crescimento comprometido e 9,0% apresentem emagrecimento extremo (OMS,1997).

Embora haja muitas formas de desnutrição infantil, o Kwashiorkor e o Marasmo destacam-se como mais graves. No Marasmo há um decréscimo de calorias e de todos os nutrientes, fazendo com que o indivíduo passe a consumir seus próprios tecidos como fonte nutricional. As proteínas plasmáticas se mantêm dentro dos valores normais, por meio dos aminoácidos do tecido muscular, visto que há mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo e de aminoácidos do tecido

muscular causado pela ação somatotropina, do glucagon e dos glicocorticóides, que ocorre por conta do jejum prolongado (TRINDADE; NOBREGA; TONETE, 1986).

No Kwashiorkor o organismo se ajusta de maneira diferente. Embora mantenha o cortisol aumentado, seu nível é inferior ao observado no Marasmo, fazendo com que a síntese de proteínas plasmáticas, principalmente de albumina, reduza em consequência de um déficit de aminoácidos do plasma (TRINDADE; NOBREGA; TONETE, 1986).

Quando há falta de ingestão protéica, os aminoácidos ingeridos não são compatíveis às necessidades do organismo, comprometendo a síntese proteica estrutural de enzimas, de neuropeptídeos e de neurotransmissores. Além disso, há prejuízo no desenvolvimento físico e metabólico da criança (GALLER; SHUMSKY; MORGANE; 1995; ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996; RAFAEL; MORA, 1999; DIAZ-CINTRA et al., 2007; FEOLI et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2008; MIÑANA-SOLIS; ESCOBAR, 2008).

A desnutrição proteica leva ao comprometimento da cicatrização de feridas, da regeneração de tecidos e do crescimento, também alterando as funções imunológicas, interferindo nas etapas principais no processo de regeneração, causando alterações no processo de síntese de proteínas e na quebra do colágeno (SILVEIRA, 1997).

O tecido muscular é sensível à desnutrição proteica, por se tratar de um reservatório de proteína do organismo. A desnutrição proteica gera alterações nas fases de crescimento e diferenciação nas fibras musculares, diante disso alguns estudos tem se preocupado em questionar até que ponto a desnutrição

e a recuperação nutricional afetam o tecido muscular, com o intuito de descobrir se o organismo pode voltar ao seu estado nutricional saudável quer na fase intra-uterina, no pós natal, durante o crescimento ou o desenvolvimento (IHEMELANDU, 1985; NASCIMENTO et al., 1990; MELLO, 1994).

O músculo esquelético apresenta capacidade de alterar suas propriedades estruturais e funcionais, de acordo com as condições ambientais, mudando a quantidade e tipo de proteínas, adaptando o músculo aos estímulos (MICHAEL, 2000; BALDIWIN; HADDAD, 2002; CAPITANIO et al., 2006), além de apresentar uma extraordinária capacidade de regeneração após uma lesão (LOPES-MARTINS et al., 2006; FISHER; RATHGABER, 2006).

O processo de regeneração muscular se divide em quatro fases: degeneração, inflamação, regeneração e remodelação (CRISCO et al., 1994). Nas primeiras horas pós-lesão ocorre a fase de degeneração, que é caracterizada pela lesão das miofibrilas, descontinuidade do sarcolema, necrose celular, formação de hematoma, seguida de uma resposta inflamatória (SVERZUT; CHIMELLI, 1999; TIDBALL, 2005; JÄRVINEN et al., 2005a).

Na fase inflamatória, os primeiros a invadirem o local da lesão são os neutrófilos realizando a remoção dos detritos celulares, e em seguida os macrófagos removem o tecido morto e estimulam a produção de citocinas que ativam as células satélites (FIELDING et al., 1993, BELCASTRO et al., 1996; KANNUS, 2003; JARVINEN et al., 2005b).

Na fase de regeneração, as células satélites são ativadas e marcadores da linhagem miogênica, como *myogenia differentiation* (MyoD) são expressos. A MyoD regula o estágio inicial da regeneração com a ativação e proliferação das células

satélites, na fase mais tardia do processo, outros marcadores como a Miogenina indicam a diferenciação e maturação dos mioblastos. (FUCHTBAUER; WESTPHAL, 1992; RANTANEN et al., 1995; CREUZET et al., 1998; JARVINEN et al., 2005b).

Durante a fase de remodelação ocorre a maturação das miofibrilas e organização da matriz extracelular, levando a restauração da capacidade funcional do músculo lesado (TIDBALL, 1995; KANNUS, 2003; GOETSCH et al., 2003; JARVINEN et al., 2005b).

As fases de reparação e remodelação geralmente estão sobrepostas e 21 dias após a lesão o músculo está praticamente regenerado, como observado na figura 1 (JARVINEN et al., 2005a).

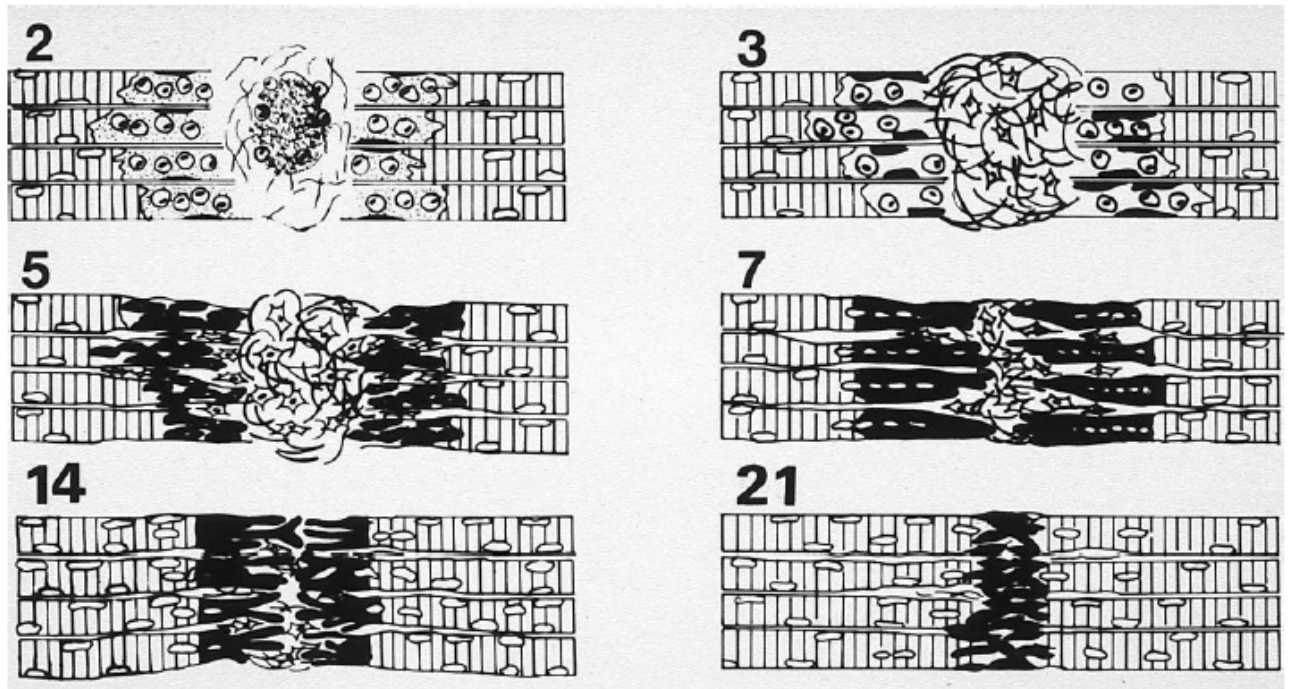


Figura 1. Representação do processo de regeneração em 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-lesão. Dia 2: as partes necrosadas das fibras musculares são removidas por macrófagos, ao mesmo tempo inicia-se a formação do tecido conjuntivo por fibroblastos; Dia 3: ativação das células satélites dentro da lâmina basal no local da regeneração; Dia 5: fusão de mioblastos em miotubos, e o tecido conjuntivo tornou-se mais denso; Dia 7: as células musculares regeneradas se estendem para fora dos antigos cilindros da lâmina basal e começam a invadir a região da cicatriz. Dia 14: a cicatriz apresenta tamanho reduzido e as miofibras regeneradas fecham o local da lesão. Dia 21: as miofibrilas se fundem, com pouco tecido conjuntivo (cicatriz) entre elas (JÄRVINEN et al., 2005a).

O sucesso do reparo muscular depende da extensão e da natureza da lesão, mas em todas as situações o processo envolve as quatro fases da regeneração. Pode-se dizer que fatores externos, como o tratamento fisioterapêutico, buscam acelerar o processo de regeneração, para se restabelecer a função o mais rápido possível (CARLSON; FAULKNER, 1989; PINTO; CASTILLO, 1999; FERRARI et al., 2005; JARVINEN et al., 2005b).

Todo o processo de regeneração muscular requer a utilização de nutrientes, seja na ativação do sistema imunológico ou na formação das novas fibras

musculares. Fatores como a desnutrição afetam negativamente a proliferação de células satélites, que resultam na hipotrofia do músculo e diminuição no número de mionúcleos ( CARLSON; FAULKNER, 1988; DEDKOV et al., 2001).

Sendo assim a hipótese deste trabalho é de que as alterações fisiológicas observadas durante a desnutrição infantil podem comprometer a regeneração muscular na fase adulta.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a evolução da regeneração muscular após criolesão no músculo tibial anterior de ratos jovens recuperados da desnutrição proteica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Acompanhar o desenvolvimento dos animais, analisando a massa corporal e quantidade de ração consumida diariamente;
- Avaliar morfológicamente os efeitos da desnutrição no sistema muscular após 14 dias de criolesão em animais jovens recuperados de desnutrição proteica, por meio da área de secção transversa e percentual de tecido conjuntivo;
- Avaliar o conteúdo das proteínas MyoD, miogenina e da citocina TGF-B1 em diferentes tempos (7, 14 e 21 dias) após a criolesão.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 40 ratos jovens da linhagem Wistar. Os animais foram adquiridos na Anilab Paulínia/SP 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 5 animais em cada caixa de polietileno de tamanho médio. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP, sob o protocolo 04/14 (Anexo 1).

#### **3.1 Nutrição**

Os animais do grupo Nutrido (N) receberam dieta normoproteica (14% de proteína) por 90 dias. Os animais do grupo Desnutrido Recuperado (DR) foram submetidos a duas fases nutricionais, correspondendo a 45 dias de desnutrição, com dieta hipoproteica (6% de proteína), seguida de 45 dias de dieta normoproteica (14% de proteína).

Foram empregadas dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) comercializada por PragSoluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE: 401.091.476.112-ME (Tabela 1).



Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas pelos grupos experimentais

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta AN 93 – 14% proteína</b>	<b>Dieta AN – 6% proteína</b>
	<b>(p/1 Kg)</b>	<b>(p/1 Kg)</b>
Amido de milho	465.700	508.000
<b>Caseína</b>	<b>140.000</b>	<b>66.000</b>
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
<b>TOTAL</b>	<b>1000.0</b>	<b>1000.0</b>

A massa corporal foi verificada após o primeiro dia da chegada dos animais ao biotério e repetida a cada sete dias, até o fim de todo período experimental, por meio de uma balança digital calibrada (GEHAKA, BG 1000). Da mesma forma foi realizado um controle de ingestão da ração por caixa.

### **3.2 Grupos Experimentais**

Os animais recém desmamados foram divididos aleatoriamente em:

- Grupo Nutrido (N; n=20): submetidos somente à dieta normoproteica;
- Grupo Desnutrido Recuperado (DR; n=20): submetidos à dieta hipoprotéica por 45 dias e recuperados por mais 45 dias com ração normoproteica.

Ao completar a fase de recuperação (111 dias de vida) todos os animais foram submetidos à criolesão e realocados aleatoriamente em seis grupos, para melhor avaliação da resposta tecidual: Grupo Nutrido Lesado (NL) 7, 14 e 21 dias; e Grupo Desnutrido Recuperado Lesado (DRL) 7, 14 e 21 dias. Para análise morfológica foram utilizados apenas os animais 14 dias (NL, n=5; DRL, n=5) e para análise bioquímica foram utilizados todos os tempos (NL, n=15; DRL, n=15).

### **3.3 Procedimento da Lesão Muscular**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após apresentar sinais de anestesia, os animais foram tricotomizados na região a ser lesada, o músculo tibial anterior direito foi exposto e lesado com uma barra metálica de 1 x 0,5 cm resfriada em nitrogênio líquido à -196°C por 30 segundos. A barra foi pressionada sobre o ventre muscular por 10 segundos, em seguida imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada no mesmo lugar do músculo por 10 segundos, segundo protocolo de Miyabara et al. (2006) (Figura 2). A fáscia muscular e a pele foram suturadas e os animais foram acondicionados individualmente em caixas com ração e água *ad libidum* até a recuperação. Após 24 horas foram acondicionados em caixas maiores com 3 animais cada.

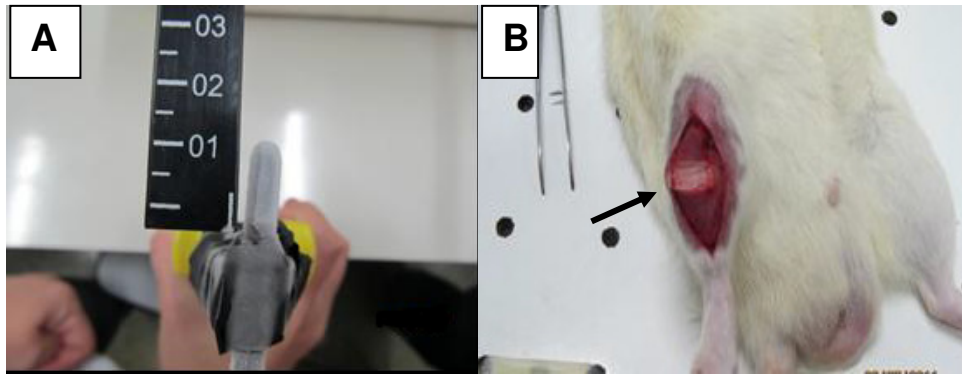


Figura 2 - Em A: barra metálica. Em B: Músculo tibial anterior após a criolesão; a seta indica o local da lesão.

### 3.4 Eutanásia dos Animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após sinais de anestesia geral, o músculo tibial anterior direito (lesado) e esquerdo (controle) foram retirados e pesados. O terço médio dos músculos foi separado para as análises. A eutanásia ocorreu respeitando os tempos de cada grupo 7, 14 e 21 dias após o protocolo de lesão muscular.

### 3.5 Análise Histológica

O terço médio dos músculos tibial anterior direito e esquerdo foram fixados em suporte de madeira com *tragacanth gum*, imerso em isopentano à  $-80^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção dos cortes histológicos, a amostra foi descongelada por aproximadamente 30 minutos até atingir a temperatura de  $-23^{\circ}\text{C}$ , e seccionado

transversalmente utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais seriados com espessura de 8 µm foram coletados para:

### **3.5.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)**

Foi utilizada para a mensuração de áreas de secção transversal e a quantificação da área de inflamação/regeneração muscular. Os cortes foram fixados em Bouin por 30 minutos e posteriormente lavados em álcool 70% por 12h. No dia seguinte foram lavados em água corrente por 10 minutos e corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente 10 minutos. Em seguida os cortes foram corados com eosina e as lâminas foram lavadas em água destilada, após a lavagem iniciou a desidratação em álcool e a diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan.

### **3.5.2 Coloração por Tricrômico de Masson**

Foi utilizada para a quantificação do tecido conjuntivo. Os cortes foram fixados em Bouin por 3h. Posteriormente foram lavados em solução de álcool 70% por 12h e em água corrente por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente 10 minutos. As lâminas foram imersas em solução de Masson (0,7g de Ponceau Fucsina, 0,03g de Fucsina ácida, 0,7g de Orange G e 100 mL de solução de ácido acético 0,2%) por 15min, banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de verde-luz. Para retirar o excesso de verde-luz, as lâminas serão imersas em solução aquosa de ácido acético a 0,2%. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

## **3.6 Técnica de Immunoblotting**

### **3.6.1 Preparação de Extrato Total**

O músculo tibial anterior foi cortado em pequenos pedaços e homogeneizado em tampão específico, com volume variando entre 600 a 1000 uL, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total.

### **3.6.2 Eletroforese**

As amostras dos extratos proteicos foram tratadas com tampão Laemmli, acrescido de ditiotreitol 100 mM e aquecidas banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean). Foram obtidos 3 extratos protéicos por grupo, resultando em 12 géis. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizado em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal contendo 5% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 µg de anticorpo primário diluído em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente.

Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Pierce) por 5 minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento G-Box (GeneSys).

Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5;  $\beta$ -*Mercaptoethanol* 0,1M; Uréia 8M) durante 1h, à 60° C. Posteriormente as membranas foram incubadas em Tris-HCl 1M pH 7,5 por 30 min para neutralizar o *stripping*, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas.

### **3.6.3 Anticorpos**

#### **Anticorpos Primários**

- MyoD (m-318), rabbit policlonal, Santa Cruz: sc-760;
- TGF- $\beta$ 1, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
- Miogenina, mouse monoclonal, Sigma, M5815.
- Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540

#### **Anticorpos Secundários**

- Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2004;
- Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005.

### **3.7 Análise dos resultados**

#### **3.7.1 Quantificação da área de regeneração e tecido conjuntivo**

Para as lâminas coradas com HE, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram escolhidos para que ao final se obtivesse a área de secção transversa das fibras musculares normais (controle) e em processo de regeneração, além da porcentagem da área total do músculo em processo de regeneração associado ao infiltrado inflamatório.

As áreas de inflamação e regeneração foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central. As fibras normais apresentam maior diâmetro e núcleo periférico (MARQUES et al., 2008). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 20X e conectado a um computador com software ImagePro-Plus<sup>®</sup> 6.0 (Media Cybernetics).

A quantificação do tecido conjuntivo nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson foi realizada por meio do software Image Pro Express com imagens adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acopladas ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 20X, onde foram analisadas 12 imagens, que foram escolhidas aleatoriamente, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 210 intersecções, onde foram contabilizadas quais estavam sobre o tecido conjuntivo, e posteriormente o resultado foi transformado em porcentagem.

### **3.7.2 Análise bandas imunorreativas**

As bandas observadas na técnica de immunoblotting foram captadas no sistema G-Box (GeneSys), salvas como imagem e a quantificação da densitometria óptica foi realizada pelo programa Image J<sup>®</sup>. Os dados foram apresentados como unidades arbitrárias, obtidos pelos valores da proteína estudada dividido pelo GAPDH.

### **3.8 Análise dos dados**

A avaliação dos dados foi realizada através do programa Bioestat versão 5.9. Para comparação entre os grupos nos diferentes tempos foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) one way, seguido de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para dados paramétricos. Para análise dos dados de peso corporal, consumo alimentar, AST, quantificação de tecido conjuntivo e inflamação, foi utilizado o teste *t Student*. Em todos os casos foi adotado um valor de  $p < 0,05$  para significância estatística.



#### 4. RESULTADOS

Ao final do período de desnutrição, os animais com 66 dias de vida apresentaram a massa corporal 67,8% menor que os animais nutridos ( $p < 0,05$ ). Com a introdução da dieta normoproteica, a massa corporal tornou-se similar entre os grupos, e ao completar o período de recuperação (111 dias), a diferença foi de apenas 19,5%, sendo maior no grupo nutrido, entretanto sem diferença estatística (Tabela 2).

O consumo alimentar foi menor no grupo desnutrido (66 dias), durante a ingesta da ração hipoproteica, quando comparado ao grupo nutrido ( $p < 0,05$ ). No período de recuperação o consumo da ração normoproteica foi similar entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Media e desvio padrão da massa corporal e consumo alimentar (em gramas / por dia) nos grupos avaliados. Desnutrido 66 dias: consumo de ração hipoproteica por 45 dias após o desmame; Desnutrido/Recuperado: recuperação da desnutrição com dieta normoproteica por 45 dias; Nutrido: consumo de ração normoproteica por todo o período experimental.

	<b>Desnutrido 66 dias</b>	<b>Desnutrido / Recuperado 111 dias</b>	<b>Nutrido 66 dias</b>	<b>Nutrido 111 dias</b>
<b>Massa corporal (g)</b>	74,2 ± 13,1	279,9 ± 18,1	230,2 ± 15,3*	348,2 ± 25,4
<b>Consumo</b>	6,36 ± 0,9	28,84 ± 3,7	16,4 ± 2,7*	25,7 ± 6,7

alimentar/dia (g)				
----------------------	--	--	--	--

\* difere do grupo Desnutrido 66 dias,  $p < 0,05$

Após 14 dias da lesão muscular a área de inflamação / regeneração foi duas vezes maior no grupo desnutrido/recuperado lesado (DRL), quando comparado ao grupo nutrido lesado (NL) ( $p < 0,05$ ). Também houve diferença estatística significativa na porcentagem de tecido conjuntivo, sendo maior no grupo DRL ( $p < 0,05$ ). Tais resultados indicam que o grupo DRL apresenta um atraso na regeneração, pois a fase inflamatória permanece por mais tempo (Figuras 2 e 3).

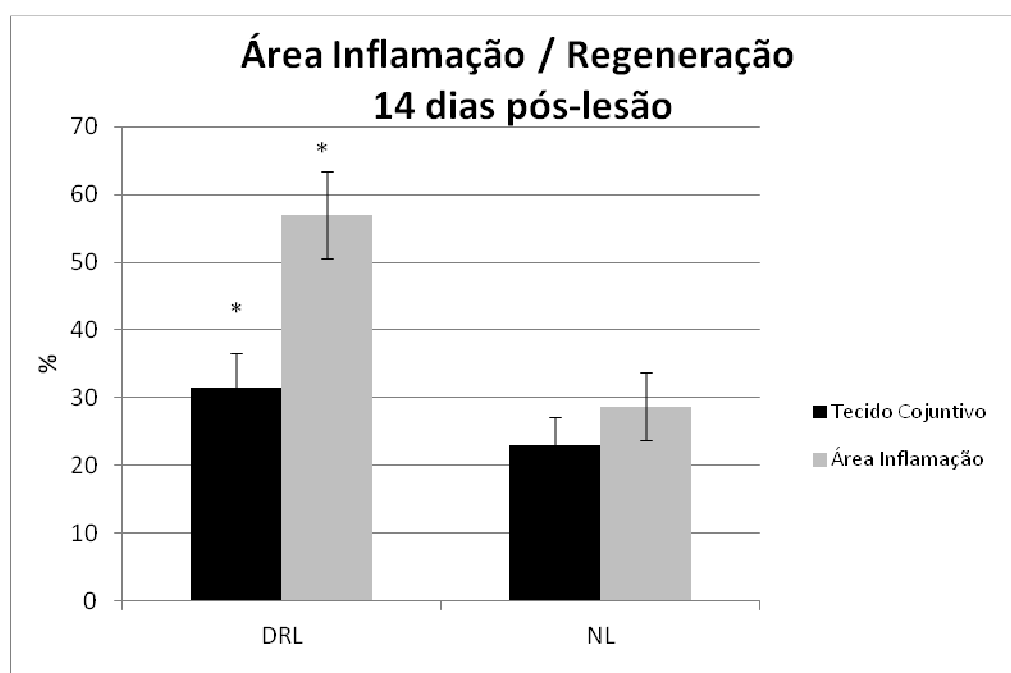
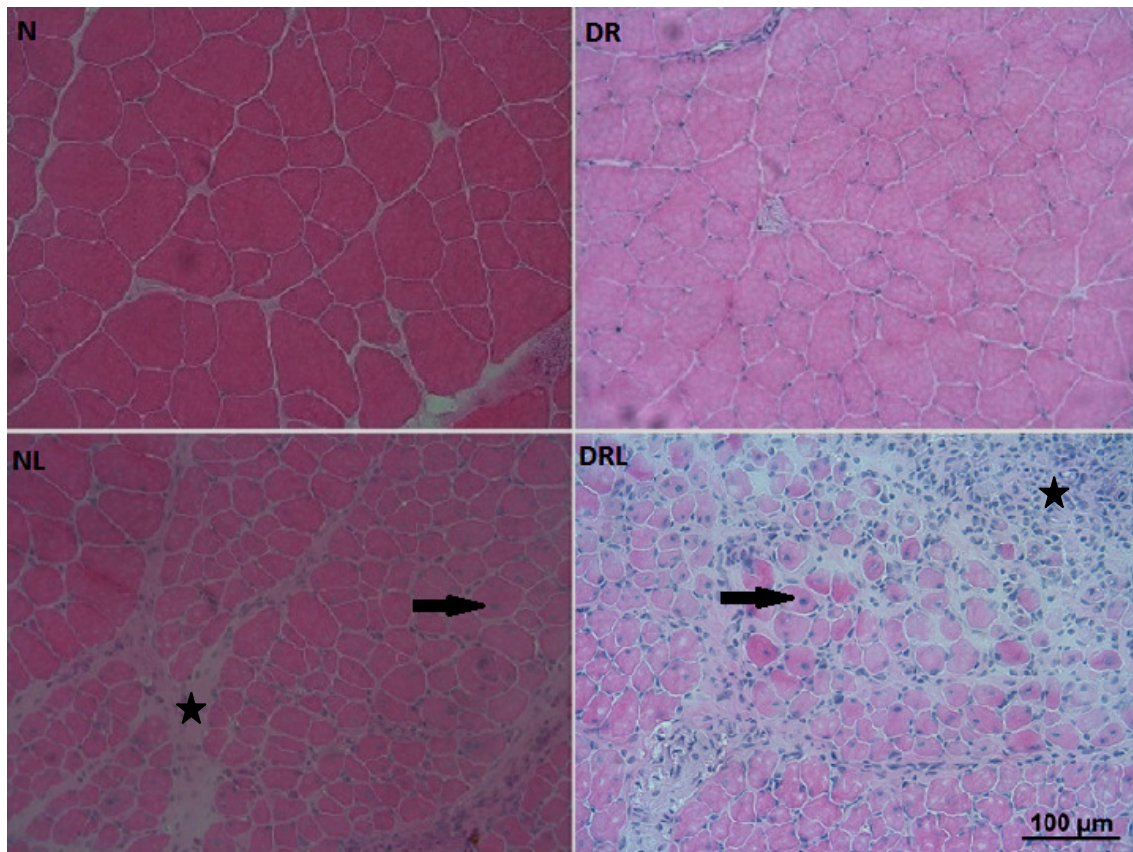


Figura 2 – Média e desvio padrão da porcentagem de tecido conjuntivo e área de inflamação nos grupos desnutrido recuperado lesado (DRL) e nutrido lesado (NL).

\* difere do respectivo grupo NL,  $p < 0,05$



\* área de inflamação

Figura 3 – Cortes transversais do músculo tibial anterior corados com HE. Grupo Nutrido (N): fibras controle; Grupo Nutrido Lesado (NL): fibras em processo de regeneração; Grupo Desnutrido Recuperado (DR): fibras controle; Grupo Desnutrido Recuperado Lesado (DRL): fibras em processo de regeneração. Setas indicam a posição centralizada do núcleo. Barra = 100 µm. ★ Indica área de inflamação.

Para avaliação da área de secção transversa (AST) foram analisadas as fibras em processo de regeneração pós-lesão, ou seja, as fibras com núcleo centralizado, e as fibras normais (núcleo periférico) dos dois grupos. Quatorze dias pós-lesão, as fibras regeneradas do grupo DRL atingiram 74% da AST quando comparadas às fibras normais (controle) do mesmo grupo (DR), sendo esta redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). No grupo NL, as fibras regeneradas pós-lesão atingiram 88% do seu controle (N), não sendo observada diferença estatística (Figuras 3 e 4).

Na comparação entre os grupos desnutridos e nutridos nota-se que a AST foi menor no grupo DR ( $p < 0,05$ ). Tal resultado indica que mesmo com o processo de recuperação dos animais DR (45 dias de ração normoproteica), a fase de desnutrição trouxe consequências para o tecido muscular (Figuras 3 e 4).

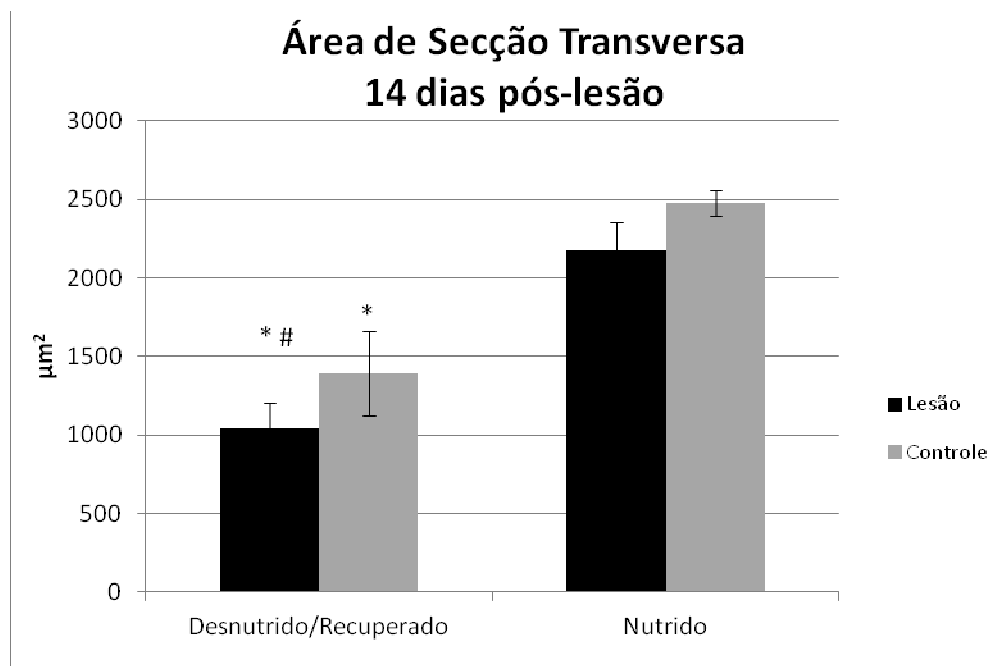


Figura 4 – Média e desvio padrão área de secção transversa dos grupos Desnutrido/Recuperado e Nutrido. Lesão: TA direito; Controle: TA esquerdo.  
\* difere do respectivo grupo Nutrido,  $p < 0,05$ ; # difere do controle do mesmo grupo,  $p < 0,05$ .

A proteína MyoD, relacionada à diferenciação e proliferação das células satélites, apresentou maior conteúdo ( $p < 0,05$ ) no grupo nutrido lesado 7 dias (NL7), quando comparado ao grupo DRL7, sugerindo um retardo na ativação dessas células em decorrência da desnutrição (Figura 5).

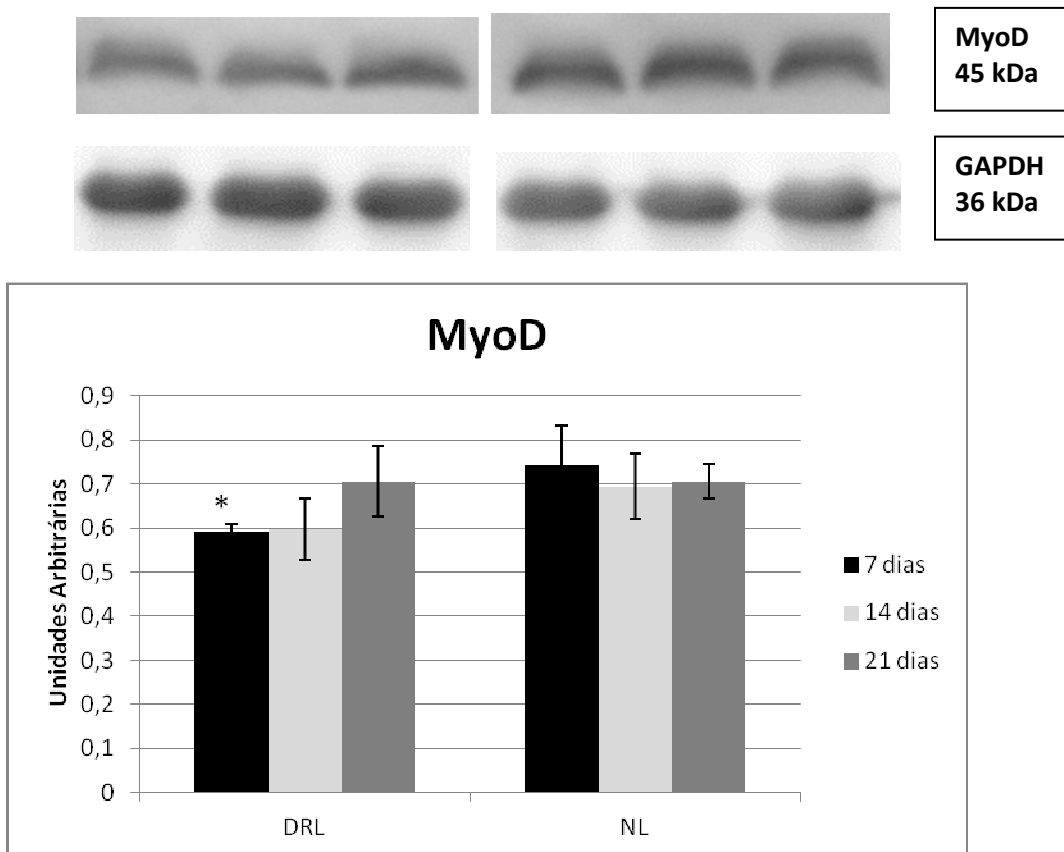


Figura 5 – Bandas imunorreativas das proteínas MyoD e GAPDH. Média e desvio padrão do conteúdo MyoD/GAPDH (unidades arbitrárias) nos grupos desnutrido recuperado lesado (DRL) e nutrido lesado (NL), nos diferentes tempos avaliados. \* difere do grupo NL7,  $p < 0,05$

Em relação à miogenina, proteína relacionada à diferenciação e início da maturação dos mioblastos, nota-se que o conteúdo foi 45,2 % maior ( $p < 0,05$ ) no grupo nutrido 14 dias (NL14), quando comparado ao 21 dias do mesmo grupo (NL21), indicando que em 14 dias as fibras estavam em processo de regeneração mais avançado no grupo nutrido. De forma oposta, no grupo DRL não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos avaliados (Figura 6)

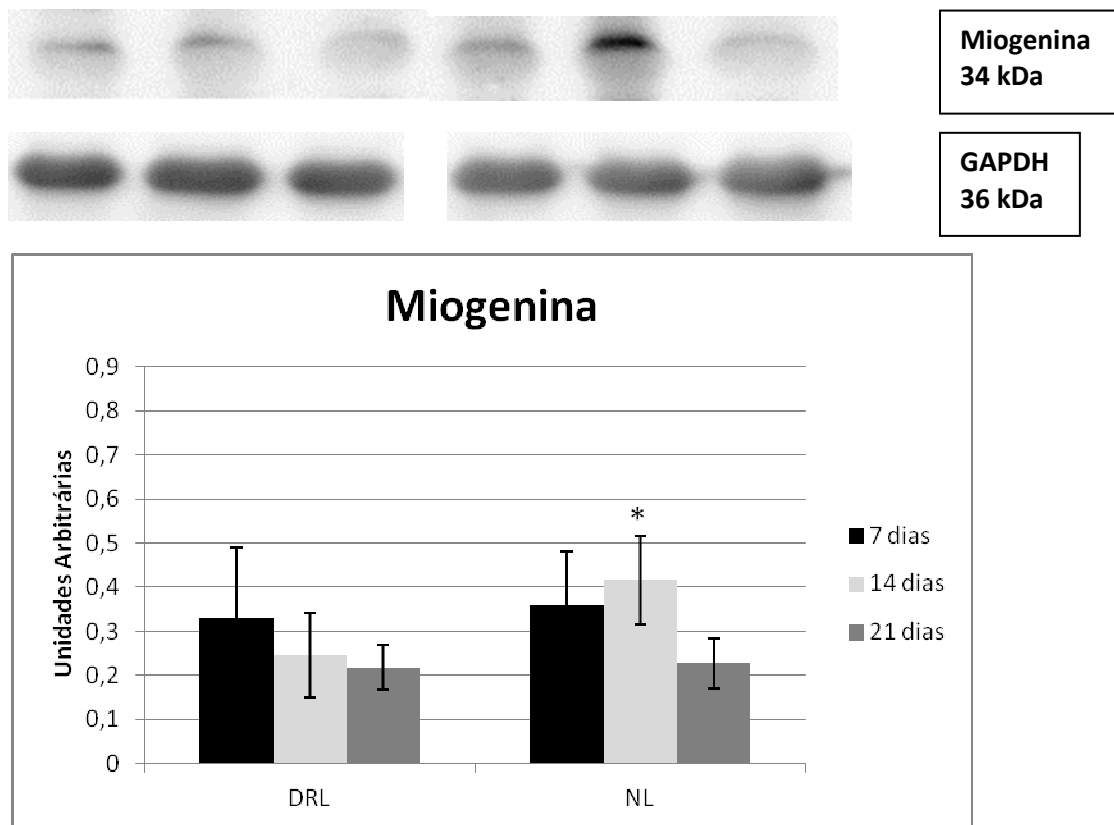


Figura 6 – Bandas imunorreativas das proteínas Miogenina e GAPDH. Média e desvio padrão do conteúdo Miogenina/GAPDH (unidades arbitrárias) nos grupos desnutridos recuperados lesados (DRL) e nutridos lesados (NL), nos diferentes tempos avaliados. \* difere do grupo NL21,  $p < 0,05$

O conteúdo da citocina TGF- $\beta$ 1 foi similar entre os grupos. Em 7 dias nota-se o aumento do conteúdo ( $p < 0,05$ ) nos grupos DR7 e N7, quando comparados aos demais períodos avaliados (Figura 7).

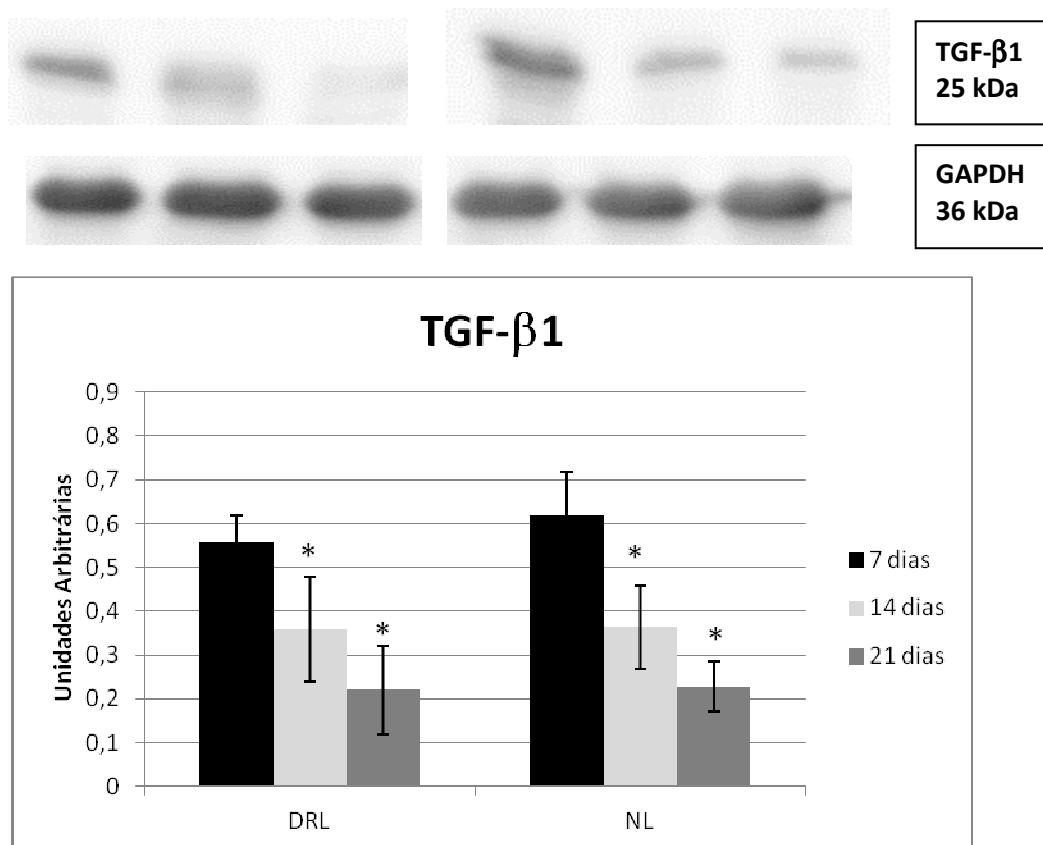


Figura 7 – Bandas imunorreativas TGF- $\beta$ 1 e GAPDH. Média e desvio padrão do conteúdo TGF- $\beta$ 1/GAPDH(unidades arbitrárias) nos grupos desnutridos recuperados lesados (DRL) e nutridos lesados (NL), nos diferentes tempos avaliados. \* difere do respectivo grupo 7 dias,  $p < 0,05$

## 5. DISCUSSÃO

O protocolo de desnutrição e recuperação nutricional proposto neste estudo evidenciou alterações musculares decorrentes do período de restrição proteica. Os animais do grupo DR apresentaram maior área de inflamação e porcentagem de tecido conjuntivo 14 dias após a criação, o processo de regeneração muscular mostrou-se comprometido, com redução da AST e das proteínas MyoD e miogenina em etapas características de proliferação e diferenciação das células satélites e maturação dos mioblastos.

A desnutrição afeta significativamente o crescimento e a diferenciação das células e, quanto mais precoce a desnutrição, maior o comprometimento dos tecidos e órgãos (IHEMELANDU,1985). Estudos em ratos, cachorros e macacos demonstram que a restrição proteica durante a gestação afeta a massa corporal e o número de fibras musculares da prole (NASCIMENTO et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1999; NUNES et al., 2002).

Neste estudo os animais iniciaram o período de desnutrição aos 21 dias de vida e após 45 dias apresentaram redução no consumo alimentar e na massa corporal quando comparado ao controle (nutrido). Tais dados corroboram com estudos de Escrive et al. (1991) que destacam que a redução do ganho de massa corporal em ratos jovens submetidos a restrição proteica por quatro semanas, é um fenômeno associado a alterações funcionais na ação da insulina nos tecidos.

Latorraca et al. (1998) avaliaram a prole de ratas desnutridas durante a gestação e amamentação. Os animais expostos a dieta hipoproteica (6% de proteína) apresentaram redução na secreção de insulina em resposta à glicose,



provavelmente como consequência da absorção deficitária de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células pancreáticas desnutridas.

Após o período de recuperação (45 dias), os animais do grupo DR apresentaram o consumo alimentar e a massa corporal similar ao grupo N, entretanto a análise histológica demonstrou que a AST das fibras do músculo tibial anterior foi 44% menor que o controle (nutrido), indicando que a restrição alimentar afetou o desenvolvimento do tecido muscular.

A diminuição do número e do diâmetro das fibras em animais jovens desnutridos ocorre por perda de miofibrila e conseqüentemente perda de fibras. O miotubo necessita de proteína para síntese de actina e miosina que acontece após a fusão dos mioblastos (IHEMELANDU, 1985).

Bedi et al. (1982) avaliaram os músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo em ratos analisando a AST, número total de fibras musculares e a frequência de diferentes tipos de fibras. Os animais foram divididos em dois grandes grupos, sendo um submetido a desnutrição desde a gestação e durante o aleitamento, e outro grupo foi desnutrido pós-desmame. Todos os animais foram recuperados nutricionalmente por longo período de tempo. Os resultados indicaram que a desnutrição durante a gestação e o aleitamento causou comprometimento nos animais, como redução da massa corporal, redução do peso dos músculos e diminuição da AST, mesmo após 5 meses de recuperação com dieta normal. Entretanto, os animais desnutridos pós-desmame e nutridos normalmente por 7 meses, não evidenciaram comprometimento do tecido muscular, mostrando recuperação dos músculos.

Neste estudo, os animais foram desnutridos pós-desmame e o músculo tibial anterior foi avaliado com 2 meses de recuperação nutricional, demonstrando redução da massa muscular.

O estudo de Yamaguchi et al. (1993) mostrou que a restrição alimentar também reduziu o peso do músculo e a AST em ratos com idade entre 5 a 11 semanas, mas não interferiu na tipagem de fibras dos músculos (YAMAGUCHI et al., 1993).

Ruiz-Rosado et al. (2013) avaliaram a tipagem de fibras no músculo EDL, por meio de técnicas histoenzimáticas e destacaram a possível adaptação das fibras musculares em ratos adultos que passaram por restrição alimentar crônica. Quando jovens (15 a 45 dias de vida) o músculo EDL dos ratos desnutridos apresentou predomínio de fibras oxidativas, mas quando os ratos atingiram a idade adulta (130 – 365 dias de vida) a proporção de tipos de fibras dos animais controle (nutridos) e dos desnutridos foi similar. Os resultados indicaram que o organismo tenta, em longo prazo, contrabalancear as alterações provocadas pela restrição alimentar crônica.

Para avaliar o processo de regeneração no músculo desnutrido e recuperado, todos os animais foram submetidos a lesão por congelamento. Considerando que 14 dias após uma lesão muscular o local apresenta avançado processo de regeneração, redução da área de inflamação e de tecido conjuntivo (JÄRVINEN et al., 2005a), as análises histológicas foram realizadas neste período, ou seja, 14 dias após a criolesão no músculo tibial anterior.

Estudo realizado com camundongos com 2 meses de vida submetidos a desnutrição proteica-calórica, com dieta de baixa proteína contendo 4% de proteína, concluiu que o estado nutricional interfere na ativação dos macrófagos e com a capacidade do organismo estabelecer uma resposta imune. (FOCK et al., 2007).

Entretanto, o estudo de Barreto et al. (2012) analisou se a desnutrição intra-uterina provoca alterações na progressão da resposta inflamatória da prole. Os dados revelaram que o volume de edema de pata, os níveis séricos da proteína C-reativa (PCR) e níveis de albumina e de citocinas foram menores no grupo desnutrido na fase aguda da inflamação.

Após a fase inflamatória, a regeneração do músculo esquelético consiste basicamente de duas fases: regeneração da miofibra e produção de tecido conjuntivo. Estes dois processos ocorrem simultaneamente e são eventos competitivos, visto que a produção excessiva de tecido conjuntivo é capaz de inibir completamente a regeneração muscular (LEHTO et al., 1986).

Neste estudo, a área de inflamação/regeneração foi duas vezes maior no grupo DRL, como também houve aumento na porcentagem de tecido conjuntivo, quando comparados com o grupo NL. Tais resultados indicam que o grupo DRL apresentou um atraso na regeneração, pois a fase inflamatória permaneceu por mais tempo.

Outro indicativo do atraso na regeneração muscular é a redução na AST das fibras musculares regeneradas do grupo DRL, que atingiram 74% da AST das fibras musculares normais do mesmo grupo. No grupo NL não foi observado tal redução, ou seja, as fibras musculares regeneradas

apresentaram a AST similar quando comparada as fibras normais, 14 dias pós-lesão.

A fase inicial de ativação e proliferação das células satélites é caracterizada pela expressão de MyoD, que aumenta seu conteúdo na fase inicial do processo de regeneração, atingindo seu pico três dias após a lesão (TIDBALL; VILALTA, 2010). No presente estudo as amostras foram coletadas com 7, 14 e 21 dias após a lesão, sendo observado aumento do conteúdo da MyoD no grupo NL7 quando comparado ao grupo DRL7.

Com o avançar da regeneração, é expressa a miogenina, um marcador peculiar da fase de diferenciação das células satélites para reparo ou formação de novos mioblastos. Em animais jovens, seu conteúdo apresenta aumento por volta do terceiro dia após a lesão, atingindo seu pico no sétimo dia, e normalizando-se em seguida. (SRIKUEA, 2010; CORBU, 2010). Em contrapartida esses dados não foram semelhantes aos achados no presente estudo, pois notou-se aumento no conteúdo do grupo NL14, quando comparado ao grupo NL21, indicando que em 14 dias as fibras estavam em processo de regeneração mais avançado no grupo NL, quando comparado ao grupo DRL, onde o conteúdo de miogenina foi similar em todos os períodos avaliados.

O TGF-  $\beta$ 1 é uma citocina importante na síntese e remodelação da matriz extracelular, sendo assim, comumente utilizada para investigar a formação de fibrose (HELDIN et al., 1997). Contudo essa citocina também exerce influência sobre o estado de quiescência das células satélites, como foi verificado por Rathbone et al. (2011). Neste estudo o conteúdo de citocina

TGF-  $\beta$ 1 foi similar nos grupos DRL e NL, com aumento do conteúdo 7 dias após a lesão.

No grupo NL pode-se associar a redução do conteúdo de TGF-  $\beta$ 1 nos tempos de 14 e 21 dias, pela redução da porcentagem de tecido conjuntivo encontrada na análise histológica. Entretanto, nos grupos DRL não há tal associação.

A redução dos conteúdos das proteínas MyoD e miogenina no grupo DRL, a redução na AST das fibras musculares, o aumento da área de inflamação e porcentagem de tecido conjuntivo, sugerem que o processo de regeneração muscular nesses animais desnutridos pós-desmame por 45 dias e recuperados por dois meses, ocorreu de forma mais lenta que nos animais nutridos normalmente.

No estudo de Alves et al. (2008) que analisou o efeito da desnutrição proteica pré e pós-natal sobre o tecido muscular, obtiveram como resultado redução no número de fibras, retardamento na diferenciação das características morfológicas, metabólicas e contráteis dos tipos de fibras musculares esqueléticas em ratos na fase de crescimento.

A recuperação nutricional em longo prazo, por exemplo 5 ou 7 meses, podem revelar dados diferentes dos encontrados neste estudo, pois há indícios na literatura que a desnutrição intra-uterina gera comprometimentos mais duradouros, que a desnutrição pós-desmame, ressaltando a importância desse tipo de informação para os profissionais da área da saúde.

Outros experimentos devem ser realizados, com prole de ratas desnutridas e com animais recuperados por maior período de tempo, com

outras análises, como AST do músculo, número total de fibras musculares, e marcadores de inflamação como TNF- $\alpha$ .

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo proposto de desnutrição pós-desmame e recuperação nutricional por dois meses foi eficaz para demonstrar alterações no processo de regeneração do músculo tibial anterior de ratos jovens. Observou-se atraso no reparo muscular, com aumento da área de inflamação e porcentagem de tecido conjuntivo, redução da área de secção transversa das fibras musculares, redução do conteúdo de MyoD e miogenina. O conteúdo de TGF-  $\beta$ 1 não foi alterado com a restrição alimentar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. **Physiology & Behavior**. v. 60, n. 1, p. 197 – 201, 1996.

ALVES, A.P.; DÂMASO, A.R.; PAI, V.D. The Effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria**.v. 84, n.3, p. 264-271, 2008.

BALDWIN, K.M.; HADDAD, F. Skeletal Muscle Plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **Am. J. Phys Me. Rehabil.** v. 81, p. 40 – 51, 2002.

[BARRETO, R.R.](#); [FRANCO-EDE, S.](#); [BRASILEIRO, C.F.](#); [DE OLIVEIRA, A.P.](#); [DIMECH, G.S.](#); [MALTA, D.J.](#); [CAZUZU, J.S.](#); [LEITE, A.C.](#); [DA SILVA, T.G.](#); [MAIA, M.B.](#) Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. **Eur J Pharm Sci**. v.46, n.1-2, p.56-63, 2012.

BEDI, K.S.; BIRZGALIS, A.R.; MAHON, M.; SMART, J.L.; WAREHAM, A.C. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and re-fed adult animals. **Br J Nutr**. v.47, n.3, p.417-31, 1982.

BELCASTRO, A.N., ARTHUR, G.D., ALBISSER, T.A., RAJ, D.A. Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. **J. Appl. Physiol**. v. 80, p. 1331–1335, 1996.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Chamada **Nutricional Quilombola**. Brasília. DF, 2007.

CAPITANIO, M. et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 103, n. 1, p. 87-92, 2006.

CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A.; Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. **Am. J. Physiol**. v. 256, p. C1262–C1266, 1989.

CARLSON, B.M., FAULKNER, J.A. Reinnervation of long-term denervated muscle freely grafted into an innervated limb. **Exp. Neurol**. v. 102, p. 50–56, 1988.

---

\*Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)



CORBU, A.; SCARAMOZZA, A.; BADIALI-DEGIORGI, L.; TARANTINO, L.; PAPA, V.; RINALDI, R.; et al. Satellite cell characterization from aging human muscle. **Neurol Res.** v.32, n.1, p.63-72, 2010.

CREUZET, S.; LESCAUDRON, L.; LI, Z.; FONTAINE-PERUS, J. MyoD, myogenin, and desmin-nls-lacZ transgene emphasize the distinct patterns of satellite cell activation in growth and regeneration. **Exp. Cell Res.** v. 243, p. 241–253, 1998.

CRISCO, J.J.; JOKL, P.; HEINEN, G.T.; CONNELLI, M.D.; PANAJABU, M.M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **Am. J. Sports Med.** v. 22, p. 702–710, 1994.

DEDKOV, E.L.; KOSTROMINOVA, T.Y.; BORISOV, A.B.; CARLSON, B.M. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. **Anat. Rec.** v.263, p.139–154, 2001.

DIAZ-CINTRA, S.; GONZÁLEZ-MACIEL, A; MORALES, M.A; AGUILAR, A.; CINTRA, L; PRADO-ALCALÁ, R.A. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. **Experimental Neurology.** v. 208, p. 47 – 53, 2007.

ESCRIVA, F.; KERGOAT, M.; BAILBE, D.; PASCUAL-LEONE, A.M.; PORTHA, B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. **Diabetologia.** v.34, n.8, p.559-564, 1991.

FERRARI, R.J.; PICCHI, L.D.; BOTELHO, A.P.; MINAMOTO, V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Rev.Fisiot Mov.**v.18, n. 2, p.63-71, 2005.

FEOLI, A.M.; LEITE, M.C.; TRAMONTINA, A.C.; TRAMONTINA, F.; POSSER, T.; RODRIGUES, L.; SWAROWSKY, A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; LEAL, R.B.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. Developmental changes in content glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain Research,** v. 1187, p. 33 – 41, 2008.

FISHER, B.D.; RATHGABER, M. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle. **J PhysTher Sci.** v. 18, n. 1, p. 57-66, 2006.

FIELDING, R.A., MANFREDI, T.J., DING, W., FIATARONE, M.A., EVANS, W.J., CANNON, J.G. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1b accumulation in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol,** v.265, p.R166–R172, 1993

FOCK, R.A.; VINOLO, M.A.; DE MOURA SÁ ROCHA, V.; DE SÁ ROCHA, L.C.; BORELLI, P. [Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-](#)

[4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide \(LPS\) in mice.](#) **Cytokine**. v.40, n.2, p.105-14, 2007.

FUCHTABUER, E.M.; WESTPHAL, H. MyoD and Myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Developmental Dynamics**.v.193, p.34- 39, 1992.

GALLER, J.R.; SHUMSKY, J.S.; MORGANE, P.J. Malnutrition and brain development. In: Walker, W.A. and Watkins j. (Ed.) **Nutrition in Pediatrics**. v.31, p. 194 – 210, 1995.

GE, K.Y; CHANG, S.Y. Definition and measurement of child malnutrition. **Biomedical and Environmental Sciences**, v, 14, p. 283 – 291, 2001.

GOETSCH, S.C.; HAWKE, T.J.; GALLARDO, T.D.; RICHARDSON, J.A.; GARRY, D.J. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. **Physiol. Genomics**. v. 14, p. 261–271, 2003.

HELDIN, C.H.; MIYAZONO, K.; DIJKE, P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**. v.390, p.465-71,1997.

HERNÁNDEZ, A.; BURGOS, H.; MONDACA, M.; BARRA, R.; NÚÑEZ, H.; PÉREZ, H.; SOTO-MORANO, R.; SIERRALTA, W.; FERNÁNDEZ, V.; OLIVARES, R.; VALLADARES, L. Effect of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation and BDNF protein expression in the rat entorhinal cortex after neocortical and hippocampal tetanization. **Neural Plasticity**. v. 81, p.1-9, 2008.

IHEMELANDU E.C.;Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. **Acta Anat (Basel)**, v.121, p.89-93, 1985.

JÄRVINEN, T.A.H.; JÄRVINEN, T.L.N.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 745 – 64, 2005a.

JARVINEN, T.A., KAARIAINEN, M., JARVINEN, M., KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Curr Op in Rheumatol**. v.12, n.2, p.155-61, 2005b.

KANNUS, P. Et al. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. **Scand. J. Med. Sports**. v.13, p. 150-154, 2003.

LEHTO, M.; JARVINEN, M.; NELIMARKKA, O. Scar formation after skeletal muscle injury, a histological and autoradiographical study in rats. **Arch. Orthop Trauma Surg**. v.104, p. 366-370, 1986.

LATORRACA, M.Q.; REIS, M.A.B.;CARNEIRO, E.M.. MELLO, M.A.R.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.A.; BOSCHERO, A.C. Protein deficiency and

nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **J. Nutr.** v. 128, p. 1643-1649, 1998.

LOPES-MARTINS R.A.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S. et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.** v. 101, p. 283 – 88, 2006.

MARQUES M.J; MACHADO R.V.; MINATEL E.; SANTO NETO H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in mdx sternomastoid, diafragma and tibialis anterior. **Muscle Nerve.** v. 37, p. 7-61, 2008

MELLO, M.A.R. Effects of intrauterine and post natal protein-caloric malnutrition on metabolic adaptation to exercise in young rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 27, p. 6- 61, 1994.

MICHAEL K. Relationship of Skeletal Muscle Atrophy to Functional Status: A Systematic Research Review. **Biol. Res. Nurs.** v. 2, n.2, p. 118-131, 2000.

MIÑANA-SOLIS, M.D.C.; ESCOBAR, C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term impairment, in contrast to earlier and later periods. **International Journal of Biological Sciences,** v. 4, p. 422 – 432, 2008.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70 kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol,** v.290, n.4, p. C1128-38, 2006.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 26, p. 471 – 483, 2002.

NASCIMENTO O.J, MADI K, GUEDES e SILVA J.B, SOARES F.P.J, HAHN M.D, COUTO B, et al.; Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. **Arq Neuropsiquiatr,** v.48, p..395-402, 1990.

NUNES ML, BATISTA BB, MICHELI F, BATISTELLA V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **Jornal de Pediatria.** v. 78 p. 39-44, 2002.

OLIVEIRA F.L, OLIVEIRA A.S, SCHMIDT B, AMÂNCIO O.M.; Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. **J Pediatr** (Rio J), v.75, p.350-6, 1999.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Global database on child growth and malnutrition.** Geneva: WHO; 1997.

PINTO, S.S., CASTILHO, A.A. Lesão muscular: fisiopatologia e tratamento. **Rev Fisioter Mov**, v.12, n.2, p.23-6, 1999.

RANTANEN, J.; HURME, T.; LUKKA, R.; HEINO, J.; KALIMO, H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. **Lab Invest**. v.72, n.3, p.341-7, 1995.

RAFAEL, J.F.; MORA, M.D. Malnutrition: organic and functional consequences. **World Journal of Surgery**, v. 23, p. 530 – 535, 1999.

RATHBONE, C.R.; YAMANOUCHI, K.; CHEN, X.K.; NEVORET-BELL, C.J.; RHOADS, R.P.; ALLEN, R.E. Effects of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. **J Muscle Res Cell Motil**. v.32, n.2, p.99-109, 2011.

RUIZ-ROSADO, A.; FERNÁNDEZ-VALVERDE, F.; MARISCAL-TOVAR, S.; HINOJOSA-RODRIGUEZ, C.X.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, J.A.; ANZUETORIOS, A.; GUADARRAMA-OLMOS, J.C.; SEGURA-ALEGRÍA, B.; JIMÉNEZ-ESTRADA, I. Histoenzymatic and Morphometric Analysis of Muscle Fiber Type Transformation during the Postnatal Development of the Chronically Food-Deprived Rat. **J Histochem Cytochem**. v.61, p.372–381, 2013.

SILVEIRA, I.S; RAISER, A.G.; POLYODORO, A.S. Efeitos da dieta na cicatrização de fratura distais de fêmur imobilizadas com pinos intramedulares em cão. **Act Cir. Bras**. v. 12, p. 81 – 178, 1997.

SRIKUEA, R.; PHOLPRAMOOL, C.; KITIYANANT, Y.; YIMLAMAI, T. Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.37, n.11, p.1078-86, 2010.

SVERZUT, A.C.M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. **Ver. Fisioter. Univ. São Paulo**. v. 6, p. 132-139, 1999.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v.288, p.R345–R353, 2005.

TIDBALL, J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 27, p.1022-1032, 1995.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.298, p.1173-1187, 2010.

TRINDADE, C. E. P.; NÓBREGA, F. J.; TONETE, S. S. Q. Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: **Desnutrição: intra-uterina e pós-natal**. NÓBREGA, F. J. de. (Ed.). Panamed Editorial, São Paulo, 1986.

YAMAGUCHI, A.; HORIO, Y.; SAKUMA, K.; KATSUTA, S. The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fibre types during growth. **J Anat.** v.182, n.1, p.29–36, 1993

## Anexo 1

Universidade Metodista de Piracicaba  
Comissão de Ética sobre o Uso de Animais



---

Piracicaba, 18 de junho de 2014

Para: Profa. Adriana Pertille  
De: Comissão de Ética no Uso de Animais  
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 04/2014

### Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba APROVOU o protocolo de pesquisa nº 04/2014 intitulado "*Regeneração muscular em modelo experimental desnutrido: análise morfológica e bioquímica*" analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Carlos Alberto da Silva", is displayed on a light green rectangular background.

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva  
Presidente do CEUA-UNIMEP