

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

LÉSLIE CAZETTA JERONIMO

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS MUSCULARES E
JUNÇÕES NEUROMUSCULARES DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS
DE RATOS CUJAS MÃES FORAM SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA**

CASCAVEL-PR
(Agosto/2013)

LÉSLIE CAZETTA JERONIMO

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS MUSCULARES E
JUNÇÕES NEUROMUSCULARES DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS
DE RATOS CUJAS MÃES FORAM SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas da saúde

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Marcia Miranda
Torrejais

CASCAVEL-PR

(Agosto/2013)

FOLHA DE APROVAÇÃO

LÉSLIE CAZETTA JERONIMO

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS MUSCULARES E
JUNÇÕES NEUROMUSCULARES DO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS
DE RATOS CUJAS MÃES FORAM SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Miranda Torrejais
UNIOESTE - *Campus* de Cascavel

Prof^a. Dr^a. Lígia Aline Centenaro
UNIOESTE - *Campus* de Cascavel

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Bonfleur
UNIOESTE - *Campus* de Cascavel

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Michelin Matheus
UNESP - *Campus* de Botucatu

CASCADEL-PR
(Agosto/2013)

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biociências e Saúde - UNIOESTE – *Campus* de Cascavel, pelo incentivo e apoio constante.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Marcia Miranda Torrejais, pela orientação e por acreditar em meu potencial. Sempre disponível e disposta a ajudar e em muitos momentos foi conselheira, confidente e amiga, sendo referência profissional e pessoal para meu crescimento. Muito obrigada!

Agradeço as Professoras da UNESP (*Campus* de Botucatu do Departamento de Anatomia) Prof^a. Dr^a. Selma Maria Michelin Matheus e Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro pela colaboração, apoio, disponibilidade dos animais e materiais necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Lígia Aline Centenaro pela colaboração e auxílio na análise estatística.

Agradeço ao técnico de laboratório Gelson Rodrigues da UNESP (*Campus* de Botucatu do Departamento de Anatomia) pela colaboração na confecção de lâminas histológicas.

Agradeço a aluna de pós graduação Heloisa Deola Confortin pela colaboração, disponibilidade e ajuda para conclusão desta dissertação.

Agradeço as minhas amigas e amigos (Dé, Li, Rose, Kelly, Luiz) pelo apoio e incentivo. Muito obrigado!

E, meu infinito agradecimento as pessoas que mais amo: meus pais (Claudio e Aldenira), irmãos (Fernando e Claudia), cunhada e cunhado (Fernanda e Camilo) e namorado (Dinei Prado) que sempre estiveram ao meu lado me aguentando, ajudando, apoiando e incentivando. Muito obrigado.

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

Enfim, a todos aqueles que durante esses dois anos estiveram ao meu lado, me ajudando a concluir este trabalho.

RESUMO GERAL

A desnutrição energético proteica (DEP) causa alterações em diversos sistemas e órgãos, sendo seus efeitos mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer a desnutrição. O presente trabalho buscou avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos das fibras musculares e junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos submetidos à restrição proteica materna, durante os períodos de gestação e lactação. Ratos da linhagem *Wistar* foram divididos em quatro grupos: Grupo controle 21 dias - prole de mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração normoproteica (17%); Grupo restrito 21 dias - prole de mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração hipoproteica (6%); Grupo controle 365 dias - prole de mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração normoproteica (17%) até o dia do desmame e, após este período, a dieta fornecida para a prole foi ração normoproteica até a idade de 365 dias e Grupo restrito 365 dias - prole de mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração hipoproteica (6%) até o dia do desmame e, após este período, a dieta fornecida foi ração normoproteica até a idade de 365 dias. Após os períodos 21 e 365 dias, os ratos machos de cada grupo foram pesados e eutanasiados para a retirada do músculo EDL. Para o estudo histológico das fibras musculares foi realizado a técnica Hematoxilina-Eosina (HE) e para análise histoenzimológica foi feita a marcação com o Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase - (NADH-TR). O estudo ultraestrutural das fibras musculares do EDL foi conduzido no microscópio eletrônico de transmissão. Para a marcação das JNMs, amostras do músculo foram submetidas à reação Esterase Inespecífica. Os resultados mostraram diminuição do peso corpóreo nos animais restritos com 21 e 365 dias de idade. A análise histológica das fibras musculares nos animais restrito com 21 dias mostrou maior quantidade de fibras fetais, miotubos e núcleos centralizados, quando comparado com seu respectivo grupo controle. O estudo histoenzimológico revelou uma diminuição significativa da área das fibras tipo IIa nos animais do grupo restrito 365 dias de idade em relação ao grupo controle de mesma idade. Quanto ao estudo ultraestrutural, o músculo EDL nos animais do grupo restrito 21 dias apresentou dissolução da linha Z, presença de gotículas de lipídios em meio às miofibrilas e figuras de mielina nas regiões subsarcolemal e intramiofibrilar e núcleos em posição central na fibra muscular foram frequentes. No grupo restrito 365 dias também foi verificado uma desorganização da linha Z e das miofibrilas. A análise das JNMs mostrou que houve diminuição significativa da área e dos diâmetros maior e menor nos animais restritos com 21 dias quando comparado com seu respectivo grupo controle. Esses resultados sugerem que restrição proteica materna durante a gestação e lactação altera o desenvolvimento e morfologia do músculo estriado esquelético da prole.

Palavras-chaves: morfologia; morfometria; restrição proteica; músculo extensor longo dos dedos; rato.

GENERAL ABSTRACT

Protein energy malnutrition causes changes in several organs and systems and the earlier malnutrition occurs, more intense and permanent will be its effects. This study aimed to evaluate the morphological and morphometric aspects of the muscle fibers and neuromuscular junctions (end-plates) of the extensor digitorum longus (EDL) of rats subjected to maternal protein restriction during the periods of gestation and lactation. Wistar rats were divided into four groups: 1) control group 21 days - the offspring of mothers fed during gestation and lactation a normal protein diet (17 %); 2) restricted group 21 days - the offspring of mothers fed during gestation and lactation with a low protein diet (6 %); 3) control group 365 days - the offspring of mothers fed during gestation and lactation on a normal protein diet (17 %) until the day of weaning, and after this period the diet was standard diet until age 365 days; and 4) restricted group 365 days - the offspring of mothers fed during gestation and lactation with a low protein diet (6 %) until the day of weaning, and after this period the diet was standard diet until age 365 days. After the periods of 21 and 365 days, the male rats of each group were weighed and euthanized for the removal of the EDL muscle. The hematoxylin-eosin (HE) technique was performed for the histological analysis of the muscle fibers and histoenzymological analysis was performed using nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH - TR). The ultrastructural study of the EDL muscle fibers was conducted using a transmission electron microscope. For the end-plates staining, muscle samples were subjected to nonspecific esterase reaction. Restricted animals with 21 or 365 days old showed a significant decrease in body weight. Histological analysis of the fibers in the restricted animals aged 21 days showed an increased amount of fetal fibers, myotubes and centered nuclei, compared with the respective control group. Histoenzymological analysis revealed a significant decrease in the area of type IIa fibers in the animals of the restricted group aged 365 days compared with the control group of the same age. Regarding the ultrastructural study, the EDL muscle of restricted animals with 21 days old showed dissolution of the Z line, the presence of lipid droplets in the midst of myofibrils, myelin figures in the subsarcolemmal and intramiofibrillar regions and nuclei in the central position in the muscle fiber line were frequent. Disorganization of the Z line and the myofibrils was also found in animals from the restricted group aged 365 days. The analysis of the end-plates showed a significant decrease in the area, and in the major and minor diameters of the restricted animals aged 21 days compared to their respective controls. These results suggest that maternal protein restriction during gestation and lactation alters the development and morphology of the offspring skeletal muscle.

Keywords: morphology; morphometry; protein restriction; extensor digitorum longus muscle; rat.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....	12
DESNUTRIÇÃO PROTEICA.....	12
IMPACTO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA SOBRE OS MÚSCULOS ESTRIADOS ESQUELÉTICOS ..	14
JUNÇÃO NEUROMUSCULAR (JNM)	15
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO CIENTÍFICO 1	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	26
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	33
FIGURAS	36
TABELAS	40
ARTIGO CIENTÍFICO 2	42
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	53
FIGURAS	56
TABELAS	60

ANEXO A	62
ANEXO B	63

LISTA DE ABREVIATURAS

DEP: Desnutrição Energético Proteica

EDL: Extensor Longo dos Dedos

HE: Hematoxina- Eosina

JNM: Junção Neuromuscular

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

NADH-TR: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

INTRODUÇÃO GERAL

A desnutrição energético-proteica (DEP) é definida como uma variedade de condições patológicas decorrentes de deficiências de energia e proteínas em proporções variadas (MARCONDES; VAZ; RAMOS, 2008), que afetam principalmente faixas etárias mais susceptíveis como gestantes, lactentes, crianças e idosos (ONU, 2010).

A Organização das Nações Unidas (ONU) vem apresentando alarmantes estatísticas sobre a situação alimentar no mundo, destacando que 146 milhões de pessoas na América Latina, Ásia e África, sofrem desnutrição crônica e o Brasil não é exceção dentro dessa situação mundial (ONU, 2010). No Brasil, a taxa de mortalidade por desnutrição é um problema de saúde pública que atinge, principalmente, crianças menores de três anos de idade. O índice de crianças desnutridas em países desenvolvidos não chega a 5%, enquanto nos países subdesenvolvidos esses níveis podem chegar a 50%, o que caracteriza a doença como a principal causa de mortalidade infantil no mundo (VIANNA *et al.*, 2011).

Para Brasil (2005), o estudo da desnutrição infantil é importante pois, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço das mortes de crianças no mundo é atribuído à desnutrição, sendo um dos maiores problemas mundiais tratando-se de saúde pública, devido à sua alta prevalência e aos danos causados ao organismo humano.

A mortalidade por desnutrição está associada a outros problemas sociais incluindo pobreza, condições precárias de moradia, desemprego, sistema de saúde deficiente, hábitos alimentares inadequados, entre outros (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005, p. 467; BISPO *et al.*, 2010). A desnutrição infantil pode começar precocemente, na vida intrauterina e frequentemente na infância, em decorrência da interrupção precoce do aleitamento materno e da alimentação complementar inadequada nos primeiros dois anos de vida, associada muitas vezes, à privação alimentar ao longo da vida e à ocorrência de episódios repetidos de doenças infecciosas (BRASIL, 2005).

Os efeitos da DEP dependem da fase do desenvolvimento do indivíduo, sendo mais intensos e permanentes quanto mais precoce ocorrer a desnutrição

(FORTES *et al.*, 2007). A ingestão adequada de nutrientes é fundamental para a manutenção da saúde em qualquer fase da vida.

A terceira idade é um grupo etário atingido por doenças crônicas não transmissíveis, que muitas vezes apresentam importante relação com a ingestão alimentar. Estudo realizado por Abreu *et al.* (2008), mostrou uma situação alimentar preocupante nos idosos, pois quase todos apresentaram baixa ingestão energética e alta prevalência de um consumo inadequado de proteínas, vitaminas e minerais. A deficiência de um ou mais nutrientes essenciais, está associada ao aumento da mortalidade e da susceptibilidade às infecções, levando a uma redução da qualidade de vida do idoso (OTERO *et al.*, 2002; REZENDE *et al.*, 2010). Os fatores que interferiram negativamente na ingestão de energia foram a baixa renda, isolamento, uso de medicamentos e o sedentarismo. A DEP é vista, erroneamente, como parte do processo normal de envelhecimento, sendo com frequência ignorada. Os óbitos por desnutrição em idosos surgem mais como causa associada do que como causa básica (OTERO *et al.*, 2002).

A desnutrição implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos, entre eles, o músculo estriado esquelético (OSMO, 2007). O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição proteica por ser um reservatório de proteína no organismo. Portanto, quando há um déficit proteico na dieta, esse tecido torna-se alvo de depleção, ocasionando alterações nas fases de crescimento, funcionamento e diferenciação das fibras musculares (BRAMELD, 2004). Estudos realizados em ratos desnutridos relatam que o comprometimento da musculatura esquelética no animal não ocorre de forma homogênea, sendo a musculatura mais comprometida a do tronco, seguida pela do membro pélvico e a menos comprometida é a do membro torácico (SPENCE; HANSEN-SMITH, 1978).

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Desnutrição proteica

A DEP é caracterizada por uma variedade de processos patológicos que retratam não apenas uma síndrome de deficiência absorptiva, mas principalmente, as desigualdades socioeconômicas de uma localidade, visto que é causada pela dificuldade de acesso ao alimento (FAUCI; BRAUNWALD, 2006).

Síndromes clínicas denominadas *kwashiorkor* e marasmo podem ser desencadeadas devido a DEP (CAMBRI; DALIA; MELLO, 2010). O *kwashiorkor* manifesta-se com maior frequência nos três primeiros anos de vida (TORUN; CHEW, 1994). As principais características desta síndrome são o retardo no crescimento corporal, perda do tecido adiposo subcutâneo e de massa muscular, além de edema depressível que se localiza principalmente nos membros inferiores. Podem ocorrer lesões nos cabelos e também na pele. Casos de anorexia, diarreia, infecções e deficiências de micronutrientes são frequentes (MONTE, 2000). O marasmo também se instala nos primeiros anos de vida, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido frequentemente observado em crianças com seis meses de idade em fase de desmame precoce, quando passam a receber alimentação deficiente. O aparecimento é gradual e a evolução é lenta. A deficiência de crescimento e de peso é acentuada, apresentando-se em torno de 60% abaixo da normalidade (TORUN; CHEW, 1994). Os principais sinais clínicos desta síndrome incluem o baixo peso, retardo no crescimento e tecido adiposo subcutâneo escasso ou ausente. Diarreia, infecções respiratórias, parasitoses e a tuberculose geralmente estão associados, bem como sinais de carências de micronutrientes, deficiência de vitamina B e anemia ferropriva. O abdome de crianças que apresentam marasmo pode se mostrar proeminente, uma característica que auxilia na identificação da forma clínica da doença (MONTE, 2000).

A desnutrição precoce pode ocasionar déficit neuronal, com conseqüentes alterações cognitivas e modificações no desenvolvimento e crescimento da criança, podendo haver também maior suscetibilidade a crises convulsivas. Diversos distúrbios eletrolíticos foram identificados em crianças que apresentam desnutrição proteica. Além da deficiência dietética, infecções (principalmente diarreia e

parasitoses), comprometem a nutrição, induzindo má absorção e aumento da demanda metabólica para formar uma resposta imune apropriada (PORTO *et al.*, 2010).

Em condições de nutrição normal, a captação e utilização de nutrientes estão em equilíbrio e asseguram o crescimento, a maturação e a duplicação celular. Como consequência, se a nutrição está em déficit o organismo sofre sérios danos, pois a carência de nutrientes influenciará todas as fases da vida (ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008). Durante a gestação a desnutrição materna pode causar retardo no desenvolvimento fetal, persistindo ao nascimento, na fase de crescimento e continuar na vida adulta do indivíduo (GOPALAN, 2000). Os efeitos da desnutrição intra-uterina dependem da fase de desenvolvimento em que está o feto ou o órgão, sendo os efeitos mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer a desnutrição e mais tardiamente for iniciada a recuperação nutricional (GURMINI *et al.*, 2005). Estudos sugerem que a desnutrição intrauterina pode “programar” os tecidos fetais, tornando-os mais propícios a desordens associadas à alimentação, tais como diabetes tipo II, síndrome metabólica e demais doenças crônico-degenerativas na idade adulta (BERTRAM; HANSON, 2001; GLUCKMAN; HANSON, 2004).

O menor peso corpóreo é um parâmetro utilizado em muitos estudos para comprovar a desnutrição. Estudos realizados em animais alimentados com dietas hipoproteicas, o ganho de peso apresenta-se menor quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão (NEIVA; GUERINO; MELLO, 1999; NUNES *et al.*, 2002; CHAVES; MELLO, 2003; FRANÇA, 2009). Também pode ocorrer diminuição no peso de órgãos como fígado, baço e pulmões (PEREIRA, 2005).

Estudos recentes mostram uma relação entre a desnutrição intrauterina e a preferência da prole por alimentos ricos em gordura. Estes estudos foram feitos com modelos animais, mas sugerem que uma desnutrição na fase inicial do desenvolvimento pode levar a um quadro de obesidade em adultos (BELLINGER; LANGLEY-EVANS, 2005; TAYLOR; POSTON, 2007; SULLIVAN; GROVE, 2010).

Impacto da desnutrição proteica sobre os músculos estriados esqueléticos

A fibra muscular é uma célula longa, cilíndrica, multinucleada, formada por unidades denominadas sarcômeros, cuja disposição seriada é a responsável pelo aspecto estriado da fibra esquelética (FOX, 2007).

Os músculos estriados esqueléticos dos mamíferos são constituídos por diferentes tipos de fibras que apresentam características morfológicas e funcionais distintas. Estudos demonstraram a presença de três tipos básicos de fibras musculares, com diferentes nomenclaturas. Ogata (1958), usando enzimas oxidativas, classificou as fibras musculares em vermelhas, brancas e intermediárias. Brooke; Kaiser (1970), com base na ATPase miofibrilar, em meio ácido (pH 4.3 - 4.6) e alcalino (pH 10.4 - 10.6), classificaram as fibras em tipos I, IIb e IIa. Peter *et al.* (1972), com base em 3 critérios - tempo de contração, capacidade glicolítica e capacidade oxidativa - classificaram as fibras musculares em *slow twitch oxydative* (SO); *fast twitch glycolytic* (FG) e *fast twitch oxydative glycolytic* (FOG).

A restrição proteica materna pode induzir diferentes respostas sobre a musculatura esquelética da prole de diferentes espécies, se imposta em estágios específicos da gestação (MALLINSON *et al.*, 2007). Pesquisas realizadas com ratos, cães e macacos mostram que a restrição proteica materna no início ou a partir da segunda metade da gestação provoca baixo peso corporal e diminuição do número de fibras musculares da prole (NASCIMENTO *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2002).

A desnutrição na fase intrauterina afeta diretamente o músculo esquelético (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Após o nascimento, a maturidade da fibra muscular independe do estado nutricional, mas a desnutrição energética afeta o músculo esquelético quando imposta na fase de miogênese, alterando a frequência dos tipos de fibras (MARCONDES, 1976; ALVES; DÂMASO; DALPAI, 2008). Nascimento *et al.* (1990), descreveram que no músculo gastrocnêmio de ratos, tanto as fibras do tipo I como as do tipo II, foram comprometidas pela desnutrição proteica, ocorrendo maior redução nas fibras tipo II. Outra característica marcante, observado neste estudo, foi a redução no peso dos animais desnutridos em relação aos do grupo controle, sendo 50% menor nos animais desnutridos. Em estudo realizado por Ventruci *et al.* (2004), houve diminuição de cerca de 78% no peso do tecido muscular de ratos submetidos à desnutrição. Nos estudos realizados por Oliveira *et*

al. (1999), foi analisado o efeito da desnutrição intrauterina no músculo bíceps braquial de ratos *Wistar* nas primeiras e segundas gerações. Na primeira geração, a desnutrição energética acarretou hipoplasia muscular. Na segunda geração houve diminuição do número de fibras musculares, com redução do diâmetro das mesmas, mostrando maiores alterações nas fibras do tipo II. Toscano *et al.* (2010), para testar a influência da desnutrição proteica intrauterina sobre a propriedade mecânica dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos, verificaram um aumento na rigidez passiva de ambos os músculos nos animais submetidos à desnutrição, o que pode ocasionar uma diferença na elasticidade dos músculos.

Mallinson *et al.* (2007), utilizaram os músculos gastrocnêmio e sóleo de ratos como modelo experimental para verificar as alterações provocadas pela desnutrição proteica intrauterina e encontraram uma redução do número de fibras em ambos os músculos estudados. A perda de tecido muscular na desnutrição proteica pode ser considerada um mecanismo homeostático, pois promove uma redistribuição funcional das proteínas musculares para disponibilizar nitrogênio necessário para a síntese de proteínas teciduais, formação de células vermelhas e também exercer funções imunes (VOLTARELLI; MELLO, 2008).

Junção neuromuscular (JNM)

A JNM é uma sinapse especializada que ocorre entre um axônio motor e uma fibra muscular, cada fibra muscular estriada esquelética recebe uma terminação do neurônio motor pelas JNMs, as quais transmitem um impulso nervoso a uma fibra muscular individualmente. Neste local, a despolarização de membrana do nervo ocasiona a liberação de um neurotransmissor químico, a acetilcolina, que atua na membrana da fibra muscular para iniciar uma contração muscular (WALTON, 1988).

As junções neuromusculares de todos os vertebrados têm basicamente a mesma estrutura. São formadas por: 1- um terminal axônico contendo acetilcolina; 2- células de Schwann e seus prolongamentos citoplasmáticos que envolvem o terminal axônico (exceto na membrana pré-sináptica); 3- uma fenda com cerca de 500 Å de largura, contendo acetilcolinesterase e revestida por lâmina basal (a goteira sináptica primária); 4- uma membrana pós-sináptica, correspondente à uma região especializada da membrana sarcoplasmática, que contém receptores para

acetilcolina e 5- um sarcoplasma juncional, que suporta estrutural e metabolicamente a região pós-sináptica (Figura1).

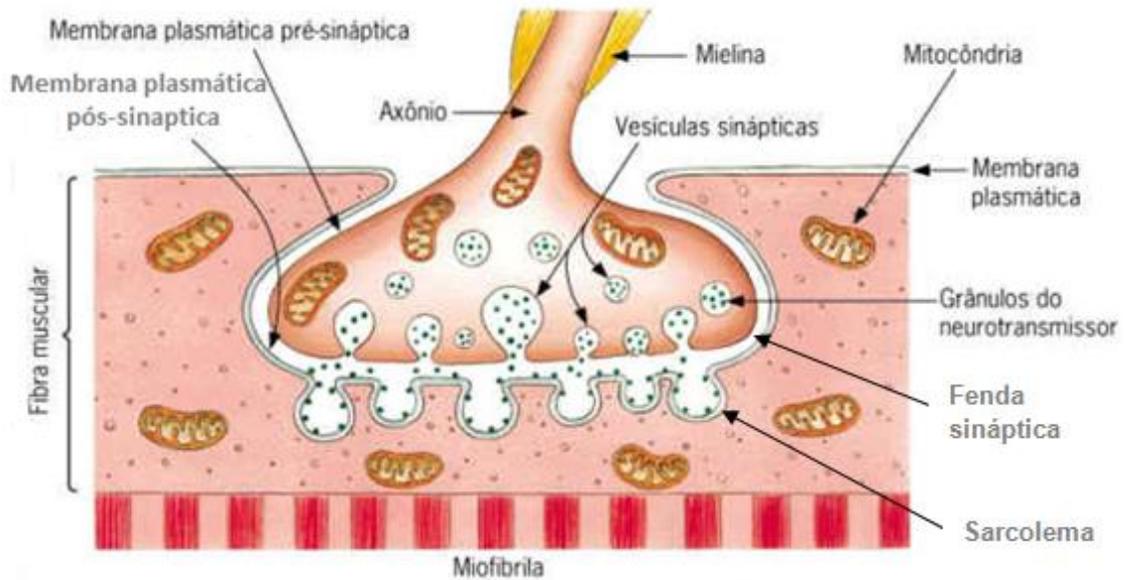


FIGURA 1 - Estrutura de uma JNM (Adaptado de CÉSAR; SEZAR, 2002).

A forma e o tamanho do terminal axônico, assim como a complexidade das membranas pré e pós-sinápticas da sinapse neuromuscular variam de acordo com os diferentes tipos de fibras musculares que inervam (OGATA, 1988; ENGEL, 1994).

A morfologia da JNM em ratos depende das fibras musculares às quais está associada. As fibras musculares vermelhas possuem junções neuromusculares com dimensões pequenas, forma arredondada ou ligeiramente elíptica, ramificação axonal grosseira com botões terminais dilatados, goteira sináptica rasa e dobras juncionais pouco profundas e simples. As fibras musculares brancas apresentam junções com dimensões maiores, formato elíptico, terminais axônicos finos, longos, ramificados e com botões terminais delicados; a goteira sináptica é profunda e as dobras juncionais são profundas e complexas. As fibras intermediárias exibem junções com morfologia característica, evidenciando aspectos estruturais que ficam entre aqueles apresentados pelas fibras brancas e vermelhas (OGATA; YAMASAKI, 1985).

Alguns estudos têm mostrado diferenças consistentes na eficácia da transmissão nas JNMs associada com o tipo de unidade motora (WOOD; SLATER, 1997). No rato, o músculo EDL contém unidades motoras predominantemente

rápidas que são ativadas com impulsos nervosos de curta e alta frequência (até 100Hz) (WOOD; SLATER, 2001).

Nascimento *et al.* (1990) estudaram o músculo gastrocnêmio na desnutrição proteica e consideraram que na privação proteica ocorre retardo no desenvolvimento, maturação e hipoplasia da unidade motora. Cabeço (2011) também trabalhou com restrição proteica durante a gestação e analisou as JNMs em microscopia eletrônica de transmissão da prole aos 30 dias de idade, onde observou diminuição das fendas sinápticas e a membrana pós-sináptica apresentou aspecto liso, figuras de mielina e o retículo sarcoplasmático mostrou-se dilatado.

Com base no que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo geral avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos as fibras musculares e junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (EDL), em ratos com 21 e 365 dias de idade, provenientes de mães submetidas à restrição proteica materna no período gestacional e de lactação. Dentro desta proposta, os objetivos específicos foram os seguintes:

- 1- Realizar análise do peso corpóreo e tecido adiposo;
- 2- Verificar possíveis alterações no peso e comprimento do músculo em estudo;
- 3- Avaliar as características morfológicas e ultraestruturais das fibras musculares;
- 4- Analisar através da morfometria a área e a quantificação dos diferentes tipos de fibras musculares (I, IIb e IIa);
- 5- Realizar através da morfometria a avaliação da área, diâmetro maior e menor das JNMs.

REFERÊNCIAS

- ABREU, W.C.; FRANCESCHINI, S.C.C.; TINOCO, A.L.A.; PEREIRA, C.A.S.; SILVA, M.M.S. Inadequação no consumo alimentar e fatores interferentes na ingestão energética de idosos matriculados no programa municipal da terceira idade de viçosa (MG). **Rev. Baiana Saúde Pública**, v. 32, p. 190-202, 2008.
- ALVES, A.P.; DÂMASO, A.R.; DAL PAI, V.†. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J. Pediat**, v. 84, p. 264-271, 2008.
- BELLINGER, L.; LANGLEY-EVANS, S.C. Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. **Clinical Science**, v. 109, p. 413-420, 2005.
- BERTRAM, E.C.; HANSON, M.A. Animal models and programming of the metabolic syndrome. **Brit. Med. Bulletin**, v. 60, p. 103-121, 2001.
- BISPO, K.T.C.; DUARTE, F.G.; CAMPELLO, M.C.; VIEIRA, L.A.; SILVA, D.A.R.; REGO, M.A.V. Tendência da mortalidade por desnutrição em crianças menores de quatro anos de idade no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 48-51, 2010.
- BRAMELD, J.M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. **Brit. J. Nutr.**, v. 91, p. 327-328, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar**. Brasília: 2005. Disponível em: http://www.opas.org.br/familia/UploadArq/desnutricao_grave.pdf. Acesso em: 18/12/2011.
- BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 18, p. 670-672, 1970.
- CABEÇO, L.C. **Caracterização morfológica, expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e dos receptores nicotínicos (NACHRS) no músculo estriado de ratos submetidos a restrição protéica materna**. 2011. 95 p. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Botucatu, 2011.

CAMBRI, L.T.; DALIA, R.A.; MELLO, M.A.R. Desnutrição, síndrome metabólica e exercício físico em modelos experimentais utilizando ratos. **Rev. da Educação Física/ UEM**, v. 21, p. 709-720, 2010.

CHAVES, M.G.; MELLO, M.A.R. Metabolismo glicídico em músculo estriado esquelético de ratos em repouso submetidos à restrição protéica alimentar. **Alim. Nutr.**, v. 14, p. 97-101, 2003.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1277p.

ENGEL, A.G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A.G., FRAZINI - ARMSTRONG, C. **Myology: basic and clinical**. 2. ed. New York: Edition International, v. 1, p. 261-302, 1994.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E. **Harrison Medicina Interna**. 16. ed. Rio de Janeiro: Editora Mc Graw-Hiel Interamericana do Brasil, p. 430-434, 2006.

FORTES, F.J.B.; BARROS, C.K.; COSTA, M.; PROCIANOY, R.S. Results of a program for the prevention of blindness caused by retinopathy of prematurity in southern Brazil. **J. Pediatr.**, v. 83, p. 209-216, 2007.

FOX, S.I. **Fisiologia Humana**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2007.

FRANÇA, T.G.D. **Efeito da desnutrição protéico-calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade à infecção por Staphylococcus aureus**. 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista – Botucatu, 2009.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Endocr. Metab.**, v. 15, p. 183-187, 2004.

GOPALAN, S. Malnutrition: causes and consequences. **Nutrition**, v. 16, p. 556-558, 2000.

GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L.; OLANDOSKI, M.; NORONHA, L. Desnutrição intrauterina e suas alterações no intestino delgado de ratos wistar ao nascimento e após a lactação. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, p. 271-278, 2005.

JUNIOR, C.S.; SASSON, S. **Biologia César e Sezar**. 7. ed. São Paulo: Saraiva, 2002.

MALLINSON, J.E.; SCULLEY, D.V.; CRAIGON, J.; PLANT, R.; LANGLEY-EVANS, S. C.; BRAMELD, J. M. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. **Brit. J. Nutr.**, v. 98, p. 292–299, 2007.

MARCONDES, E. Conceito e nomenclatura, classificação, etiopatogenia. In: Marcondes E. (coord.). **Desnutrição**. p. 03-28, 1976.

MARCONDES, E.; VAZ, F.A.; RAMOS, J.L. A. **Pediatria Básica: Pediatria Clínica Especializada. Tomo III**. Editora Sarvier: São Paulo, 2008.

MONTE, C.M.G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **J. Pediatr.**, v. 76, p. 285-297, 2000.

NASCIMENTO, O.J.; MADI, K.; SILVA, J.B.G; FILHO, P.J.S.; HAHN, M.D.; COUTO, B.; FREITAS, M.R.G. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição proteica estudo experimental, em ratos albinos. **Arq. Neuropsiquiat.**, v. 48, p. 395-402, 1990.

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

NUNES, M.L.; BATISTA, B.B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 39-44, 2002.

OGATA, T. A histochemical study of the red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. **Acta Med. Okayama**, v. 12, p. 216-227, 1958.

OGATA, T. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 51, p. 385-424, 1988.

OGATA, T.; YAMASAKI, Y. The three-dimensional structure of motor endplates in different fiber types of rat intercostal muscle. **Cell.Tissue Res.**, v. 241, p. 465-472, 1985.

OLIVEIRA, F.L.; OLIVEIRA, A.S.; SCHIMIDT, B.; AMÂNCIO, O.M. Desnutrição energética intrauterina em ratos: alterações musculoesqueléticas na 1ª e 2ª gerações. **J. Pediatr.**, v. 75, p. 350-356, 1999.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Relatório da Organização Mundial da Saúde coloca a desnutrição entre as principais causas de morte no planeta**. 2010. Disponível em: www.onu.org. Acesso em 25/01/2012.

OSMO, H.A. Alterações metabólicas e nutricionais em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e síndrome de imunodeficiência adquirida. **Rev. Bras. Nutr. Clín.**, v. 22, p. 328-335, 2007.

OTERO, U.B.; ROZENFELD, S.; GADELHA, A.M.J.; CARVALHO, M.S. Mortalidade por desnutrição em idosos, região Sudeste do Brasil, 1980-1997. **Rev Saúde Pública**, v.36, p. 141-148, 2002. Disponível em: www.fsp.usp.br/rsp. Acesso em 07/02/2013.

PEREIRA, M.A.G. **Influência da desnutrição energético protéica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, 2005.

PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, p. 2627-2684, 1972.

PORTO, J.A., OLIVEIRA, A.G.; LARGURA, A.; ADAM, T.S.; NUNES, M.L. Efeitos da epilepsia e da desnutrição no sistema nervoso central em desenvolvimento: aspectos clínicos e evidências experimentais. **J. Epilep. Clin. Neurophysiol.**, v. 16, p. 26-31, 2010.

REZENDE, E.M., SAMPAIO, I.B.M., ISHITANI, L.H, MARTINS, E.F., VILELLA, L.C.M. Mortality of malnourished elderly in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a multidimensional analysis focusing on multiple causes of death. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, p. 1109-1121, 2010.

SPENCE, C.A., HANSEN-SMITH, F.M. Comparison of the chemical and biochemical composition of thirteen muscles of the rata after dietary protein restriction. **Br. J. Nutr.**, v. 39, p. 647-658, 1978.

SULLIVAN, E.L.; GROVE, K.L. Metabolic Imprinting in Obesity. **Forum Nutr. Basel**, v. 63, p. 186–194, 2010.

TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp. Physiol.**, v. 92, p. 287–298, 2007.

TORUN, B.; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.) **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, v. 2, p. 950-976, 1994.

Disponível em: <http://books.google.com/books?id=S5oCjZZZ1ggC&hl=pt-BR>
Acesso em: 12 de novembro de 2011.

TOSCANO, A.E.; FERRAZ, K.M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. **Clinics**, v. 65, p. 1363-1369, 2010.

VENTRUCI, G.; SILVA, L.G.R.; MELLO, M.A.R.; MARCONDES, M.C.G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition.**, v. 20, p. 213-217, 2004.

VIANNA, C.P.; SALVIANO, D.A.; RIBAS, M.B.; SANCHES, L.C. Desnutrição Energética Proteica em Crianças Brasileiras. **Encontro de bioética do Paraná**. Curitiba, p. 121-130, 2011. Disponível em: <http://www.bioeticapr.org.br/>. Acesso em 15/07/2012.

VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Desnutrição: metabolismo proteico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício. **Motriz Rev. Edu. Fís.**, v. 14, p. 74-84, 2008.

WALTON, W.J.N. The anatomy and physiology of the motor unit. In: _____. **Disorders of voluntary muscle**. 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

WOOD, S.J.; SLATER, C.R. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast and slow twitch muscles. **J. Physiol.**, v. 500, p. 165-176, 1997.

WOOD, S.J.; SLATER, C.R. Safety factor at the neuromuscular junction. **Progress Neurobiol.**, v. 64, p. 393-429, 2001.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Impacto da restrição proteica materna na morfologia das fibras musculares e junções neuromusculares do músculo extensor longo dos dedos em ratos aos 21 dias de idade

Impacto da restrição proteica materna na morfologia das fibras musculares e junções neuromusculares do músculo extensor longo dos dedos em ratos aos 21 dias de idade

Jeronimo, L.C.¹; Confortim, H.D.¹; Centenaro, L.A.¹; Matheus, S.M.M.²; Pinheiro, P.F.F.²; Torrejais, M.M.³

¹Programa de Mestrado em Biociências e Saúde - UNIOESTE - Cascavel - Paraná - Brasil

²Departamento de Anatomia - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu - São Paulo - Brasil

³Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - UNIOESTE - Cascavel - Paraná – Brasil

RESUMO

A restrição proteica imposta na fase intrauterina afeta o músculo esquelético, podendo promover retardo nas diferenciações morfológicas das fibras musculares esqueléticas em ratos. Desse modo, o presente trabalho buscou analisar os aspectos morfológicos das fibras musculares e avaliar a morfometria das junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos aos 21 dias de idade, submetidos à restrição proteica materna durante os períodos de gestação e lactação. Ratos *Wistar* foram separados em dois grupos: Grupo controle - mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração normoproteica (17% de proteína) e Grupo restrito - mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração hipoproteica (6% de proteína). Os filhotes foram mantidos com a mãe durante todo o período de lactação (21 dias). Foi realizado estudo histológico (HE). Para a marcação das JNMs, o músculo foi submetido à reação Esterase Inespecífica. A análise histológica das fibras nos animais restrito com 21 dias mostrou maior quantidade de fibras fetais, miotubos e núcleos centralizados. Em relação ao estudo ultraestrutural, nos animais do grupo restrito observou-se dissolução da linha Z, núcleos centralizados, presença de gotículas de lipídios e vacúolos que abrigavam figuras de mielina nas regiões subsarcolemal e intramiofibrilar. A análise das JNMs mostrou diminuição significativa da área, diâmetros maior e menor nos animais restritos. A restrição proteica imposta no período de gestação e lactação pode ter afetado o desenvolvimento do músculo esquelético, produzindo um retardo na diferenciação do tecido muscular e alterações na ultraestrutura do músculo esquelético da prole a curto prazo.

PALAVRAS-CHAVE: morfologia; morfometria; restrição proteica; músculo extensor longo dos dedos; rato.

INTRODUÇÃO

A desnutrição energético-proteica (DEP) é definida como uma patologia decorrente de deficiências de energia e proteínas em proporções variadas

(Marcondes *et al.*, 2008), que afetam principalmente faixas etárias mais susceptíveis como gestantes, lactentes e crianças (ONU, 2010).

A mortalidade por desnutrição é resultado da associação da DEP a outros fatores como a pobreza, condições precárias de moradia, desemprego, sistemas de saúde deficientes e hábitos alimentares inadequados (Cotran *et al.*, 2005; Bispo *et al.*, 2010). A desnutrição infantil pode começar precocemente, tanto na vida intrauterina quanto na infância. Crianças sofrem de desnutrição geralmente em decorrência da interrupção precoce do aleitamento materno e da alimentação complementar inadequada nos primeiros dois anos de vida. Tal quadro está associado, muitas vezes, à privação alimentar ao longo da vida e à ocorrência de repetidos episódios de doenças infecciosas (Brasil, 2005).

A DEP implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos, entre eles, o músculo estriado esquelético (Osimo, 2007), principalmente por ser um reservatório de proteína no organismo (Brameld, 2004). A restrição proteica materna pode afetar de modo diferente a musculatura esquelética da prole de diferentes espécies, quando imposta em estágios específicos da gestação (Fahey *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Mallinson *et al.*, 2007).

Estudos realizados com animais submetidos à restrição materna, relataram uma redução do número de fibras musculares (Mallinson *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012) e redução da área em todos os tipos de fibras musculares (Silvado & Werneck, 2006; YAN *et al.*, 2012). Nascimento *et al.* (1990), revelaram que no músculo gastrocnêmio, tanto as fibras do tipo I como as do tipo II, foram comprometidas pela desnutrição, ocorrendo maior redução nas fibras tipo II. Oliveira *et al.* (1999), analisaram o efeito da desnutrição intrauterina no músculo bíceps braquial de ratos nas primeiras e segundas gerações. Na primeira geração, a desnutrição energética acarretou hipoplasia muscular e na segunda geração houve diminuição do número de fibras musculares, com redução do diâmetro das mesmas, mostrando maiores alterações nas fibras do tipo II.

Com base no que foi apresentado, o objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos morfológicos das fibras musculares e morfométrico das junções neuromusculares do músculo extensor longo dos dedos (EDL), em ratos com 21 dias de idade, provenientes de mães submetidas à restrição de proteína (6%) no período gestacional e de lactação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, do gênero masculino e feminino, proveniente do Biotério do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP - *Campus* de Botucatu, mantidos sob condições padrão de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas), temperatura em torno de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) para "Programação fetal por restrição proteica maternal em ratos machos", com o certificado de protocolo nº 264-CEEA (Anexo A).

Acasalamento dos animais

No início do experimento, duas fêmeas e um macho, em idade reprodutiva (12 semanas), foram alojados em caixas maternidade durante a noite para o pareamento. Com o objetivo de verificar presença de espermatozóides, nas manhãs que sucederam o pareamento o macho foi retirado da caixa para que o esfregaço vaginal nas fêmeas fosse realizado. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal marcou o dia 0 da gestação. Após a detecção da prenhez as fêmeas foram transferidas para caixas individuais.

No dia do nascimento, a prole foi pesada e foram mantidos oito filhotes por rata-mãe durante a lactação, para manter a disponibilidade de alimento igualitária entre todos os filhotes. Os filhotes foram mantidos com a mãe durante o período de lactação (21 dias). Após o desmame, ratos machos foram eutanasiados (Fig. 1).

Grupos Experimentais

Grupo Controle: prole de mães alimentadas durante o período de gestação e lactação com ração normoproteica (17%) ($n = 8$).

Grupo Restrito: prole de mães alimentadas durante o período de gestação e lactação com ração hipoproteica (6%) ($n = 8$).

Alimentação e água foram ofertadas *ad libitum* para ambos os grupos durante todo o experimento. As dietas eram isocalóricas e suas composições estão representadas na tabela I.

Eutanásia dos animais

Os ratos foram desensibilizados em uma câmara de CO₂ e posteriormente pesados e realizado a eutanásia por decaptação em guilhotina. Em seguida, o animal foi posicionado na mesa de cirurgia, para realização da dissecação do músculo extensor longo dos dedos (EDL). A pele e o músculo tibial anterior foram rebatidos, dos antímeros direito e esquerdo dos membros pélvicos, para a remoção do músculo EDL. Após a retirada, o músculo foi pesado e medido com auxílio de um paquímetro digital (Digimess[®], São Paulo, Brasil). O antímero direito foi coletado para o estudo histológico; o antímero esquerdo foi seccionado para o estudo histoquímico das JNMs e análise ultraestrutural das fibras musculares. Em seguida, foram coletadas e pesadas as gorduras visceral (GV) e epididimal (GE)

Estudo Histológico das Fibras Musculares

Para o estudo histológico das fibras musculares fragmentos do músculo EDL foram retirados e fixados em Karnovsky (1965) (2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M). Após a fixação, esses fragmentos foram lavados em tampão PBS, para retirada do excesso de fixador. Posteriormente o material foi submetido à inclusão em Paraplast. A inclusão do músculo foi realizada na posição vertical, para posterior secção do mesmo em corte transversal, com o auxílio de uma central de inclusão (EasyPath Cygni[®], São Paulo, Brasil). As amostras do músculo foram seccionadas a cinco µm de espessura em um micrótomo (RM2165, Leica[®], Wetzlar, Alemanha). Os cortes obtidos foram montados em lâminas previamente silanizadas e submetidos a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para observação da morfologia geral das fibras musculares (Junqueira & Junqueira, 1983).

As observações microscópicas e a fotodocumentação foram conduzidas em fotomicroscópio (Primo Star, Zeiss[®], Oberkochen, Alemanha) acoplado com câmara AxioCam ERc5s (AxioCam ERc5s; Zeiss[®], Göttingen, Alemanha), com auxílio do programa AxioVision Rel.4.8 (Zeiss[®], Microimaging Inc., Alemanha).

Estudo em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo ultraestrutural, os músculos foram removidos e reduzidos a fragmentos longitudinais (aproximadamente 1 mm de largura), fixados em solução de Karnovsky e submetidos à técnica de MET. Para a preparação da técnica, as amostras foram retiradas do fixador e lavadas em tampão fosfato 0,1M pH7,3. Em

seguida, o material foi imerso em tetróxido de ósmio por duas horas e lavado em água destilada. Após a lavagem, o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% em água destilada por cerca de 2 horas e posteriormente foi realizado a desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e por fim o emblocamento. Após a emblocagem, o material foi seccionado em cortes ultrafinos (aproximadamente 90nm). Os cortes foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50%, por cerca de 20 minutos e com citrato de chumbo por 10 minutos.

O material foi examinado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão (CM100, Philips, Eindhoven, Holanda).

Estudo das Junções Neuromusculares (JNMs)

Fragmento do músculo EDL foi removido e fixado em solução de Karnovsky (1965), mantidos em temperatura ambiente e cortado longitudinalmente em três ou quatro fatias com lâminas de inox. Os cortes obtidos foram posteriormente submetidos à reação Esterase Inespecífica (Lehrer & Ornstein, 1959).

Para o estudo morfométrico das JNMs foram utilizadas duas lâminas para cada animal. Em cada animal estudado, foram tomadas medidas da área, diâmetro maior e menor de 50 JNMs. As imagens foram capturadas com a objetiva de 20X, em fotomicroscópio (Olympus BX-60, Tóquio, Japão), com câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), com auxílio do programa DP Controler 3.2.1 276. As mensurações foram realizadas através do software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Maryland, USA).

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados referentes ao peso corpóreo, peso e comprimento do músculo, peso do tecido adiposo, além da área, diâmetro maior e menor das JNMs foram comparados utilizando o teste t de *Student*. O teste não-paramétrico de *Mann Whitney* foi utilizado quando os resultados não assumiram a distribuição Gaussiana.

RESULTADOS

Peso Corpóreo e Peso das GV e GE

A tabela II mostra os dados referentes ao peso corpóreo e peso das GV e GE os quais foram expressos através da média e desvio padrão. Os resultados mostraram uma redução do peso corpóreo e peso das GV e GE nos animais do grupo restrito quando comparados aos animais do grupo controle.

Peso e Comprimento do Músculo EDL

Os dados relativos ao peso e comprimento do músculo EDL, foram expressos através da média e desvio padrão (Tabela II). Os resultados mostraram que houve redução no peso do músculo no grupo restrito quando comparado com o grupo controle. Em relação ao comprimento do músculo, o grupo restrito apresentou um comprimento menor do que os animais do grupo controle.

Estudo Morfológico das Fibras Musculares

Nos animais dos grupos controle e restrito foi verificado presença de fibras fetais, miotubos e núcleos em posição central. Esses achados foram verificados com maior frequência nos animais do grupo restrito (Fig. 2).

Estudo Ultraestrutural das Fibras Musculares

As modificações na estrutura do músculo do grupo controle surgiram em fibras dispersas e em focos ao longo das mesmas. Em regiões vizinhas a estas, foi observado outras fibras com aparência de normalidade. Notou-se também desorganização das miofibrilas acompanhado de dissolução da linha Z (Fig. 3A), presença de figuras de mielina na região subsarcolemal ou mesmo intramiofibrilar e raramente notaram-se núcleos em posição central. Outro aspecto relevante verificado foi a presença de núcleos fragmentados (Fig. 3C).

O estudo das fibras musculares nos animais do grupo restrito demonstrou uma série de alterações morfológicas. Fibras musculares com regiões de miofibrilas rarefeitas ou frouxamente arranjadas estavam presentes. Associados a esse quadro, observou-se dissolução da linha Z (Fig. 3B), presença de várias gotículas de lipídios (Fig. 3E), vacúolos que abrigavam figuras de mielina na região subsarcolemal ou

mesmo intramiofibrilar (Fig. 3F) e núcleos fragmentados. Núcleos em posição central nas fibras musculares foram frequentes (Fig. 3D).

Análise Morfológica e Morfométrica das Junções Neuromusculares

As JNMs presentes no músculo EDL em todos os grupos estudados apresentaram morfologia clássica do tipo placa, formato oval, redondo e elíptico. Variações da forma tais como junções abertas, de formas irregulares ou compactas, foram observadas normalmente e caracterizam o polimorfismo dessas estruturas visto em diversos músculos (Figs. 4A e 4B).

Os resultados da análise da área, diâmetro maior e diâmetro menor das JNMs estão representados na tabela III. A área, o diâmetro maior e diâmetro menor apresentaram redução nos animais do grupo restrito quando comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao peso corpóreo mostraram que a alimentação das ratas, no período de gestação até o desmame, com a dieta de 6% de proteína foi capaz de causar um quadro de desnutrição na prole aos 21 dias de idade. De acordo com Torun & Chew (1994), a diminuição do peso corpóreo é um parâmetro clínico que caracteriza a DEP. A diminuição do peso corpóreo observado nos animais do grupo restrito pode estar relacionado com fatores que incluem metabolismo materno reduzido, baixo fluxo sanguíneo umbilical e inadequada transferência placentária de nutrientes (Harding, 2001). Assim, a alimentação da mãe pode ter afetado o crescimento e desenvolvimento fetal diretamente através da falta de disponibilidade e transferência de nutrientes para o feto. Porém, há relatos que contradizem esses resultados, onde os animais submetidos à restrição proteica materna não apresentaram diferenças significantes no peso corpóreo (Oliveira *et al.*, 1999; Cabeço, 2011). Essas divergências podem estar relacionadas com o tempo de duração da restrição proteica (gestação e lactação ou apenas durante a gestação ou lactação; após lactação), o tipo de dieta (aumento ou diminuição caloria/proteína) e a idade dos animais.

Neste experimento foi observado redução do peso, peso relativo e comprimento do músculo EDL nos animais do grupo restrito. Bedi *et al.* (1982) relataram que a restrição energética protéica quando ocorre após o período de

lactação pode ser recuperada com a normalização do estado nutricional, mas as alterações provocadas pela restrição energética protéica ocorridas no período da gestação e lactação, podem causar déficits permanentes. Ratos desnutridos durante a gestação e lactação, tiveram uma redução do peso do músculo EDL (Toscano *et al.*, 2008) e do músculo tibial anterior (Ventruci *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). Tal músculo, assim como o EDL, possui fibras predominantemente de contração rápida. Por outro lado, Cabeço (2011), utilizando o mesmo protocolo de dieta, mas com restrição proteica apenas na fase gestacional, não observou diferenças no peso do músculo EDL nos períodos de 30 dias e 16 semanas de idade. Essas alterações no peso do músculo, peso relativo e comprimento do músculo observado no presente estudo pode ter sido desencadeada pela quantidade de proteína ofertada aos animais no período gestacional e de lactação, sendo suficiente para afetar o desenvolvimento do músculo esquelético. Esta evidência é consistente com a hipótese de que, durante a privação nutricional, o feto sustenta o crescimento de tecidos nobres, tais como tecido do cérebro, à custa de outros tecidos como o tecido muscular (Toscano *et al.*, 2008).

A análise morfológica das fibras musculares mostrou em ambos os grupos estudados a presença de fibras fetais, miotubos e fibras com núcleos em posição central, sendo observado em maior número no grupo restrito. Estas características encontradas são indicativas de imaturidade do tecido muscular (Sarnat, 1982; Oliveira *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2008).

Na análise ultraestrutural das fibras musculares do grupo restrito foi observada uma série de alterações, como fibras musculares com regiões de miofibrilas rarefeitas ou frouxamente arranjadas, dissolução da linha Z, núcleos em posição central, presença de várias gotículas de lipídios e figuras de mielina na região subsarcolemal ou mesmo intramiofibrilar. Resultados semelhantes foram encontrados por Oumi *et al.* (2000), utilizando ratos submetidos a restrição proteica após o período de lactação, em relação a desorganização de sarcômeros e linha Z. Esses autores relataram que apesar de não saber quais os fatores envolvidos nessa desorganização, é provável que estejam associados com a desordem metabólica das proteínas nas células musculares. No grupo controle, também foram encontradas as mesmas alterações citadas no grupo restrito, porém em menor frequência. As alterações encontradas no presente estudo podem ser devido ao

processo de maturação de algumas fibras nesse período de vida, como descrito por Oliveira *et al.* (1999) e Alves *et al.* (2008).

Cabeço (2011) e Carvalho *et al.* (2009), estudaram os músculos EDL e sóleo de ratos submetidos a restrição protéica materna e encontraram a presença de algumas figuras de mielina, porém nas JNMs. Estes últimos autores relataram que as figuras de mielina sugerem remodelação. No presente estudo, provavelmente também ocorreu remodelação nas fibras musculares.

Quanto as gotículas de lipídios encontradas neste estudo, alguns autores (Nascimento *et al.*, 1990; Cabeço, 2011), também verificaram em seus estudos, porém ainda não se conhece os fatores envolvidos nestes mecanismos.

Em relação a análise da área, diâmetros maior e menor das JNMs foram significativamente menores no grupo restrito. Carvalho *et al.* (2009) estudaram as JNMs dos músculos EDL e sóleo de ratos com 30 dias de idade, que foram submetidos à restrição protéica durante a gestação, também relataram uma diminuição do diâmetro maior das JNMs apenas no músculo sóleo dos animais restritos. A diminuição da área e dos diâmetros das JNMs neste estudo, provavelmente são consequências da restrição proteica induzida principalmente no período intrauterino, pois é uma fase importante para desenvolvimento das JNMs e fibras musculares.

A análise dos resultados apresentados neste trabalho e sua avaliação permitiram as seguintes conclusões: a) A diminuição do peso corpóreo nos animais restritos pode estar relacionada com a alimentação da mãe, que pode ter afetado o crescimento e desenvolvimento fetal diretamente através da disponibilidade e transferência insuficientes de nutrientes para o feto; b) As alterações no peso e comprimento do músculo EDL nos animais do grupo restrito pode ter sido desencadeada pela quantidade de proteína ofertada aos animais no período gestacional e de lactação, sendo suficiente para afetar o desenvolvimento do músculo estriado esquelético; c) A restrição proteica imposta no período de gestação e lactação pode ter produzido um retardo na diferenciação do tecido muscular esquelético da prole; d) As alterações ultraestruturais podem ser devido ao processo de maturação de algumas fibras nesse período de vida, sugerindo que a restrição proteica materna produziu mudanças na ultraestrutura do músculo esquelético da prole a curto prazo; e) A diminuição da área e dos diâmetros das JNMs, provavelmente são consequências da restrição proteica induzida principalmente no

período intrauterino, pois é uma fase importante para desenvolvimento das JNMs e fibras musculares.

REFERÊNCIAS

Alves, A. P.; Dâmaso, A. R. & Dal Pai, V.†. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J. Pediatr*, 84:264-71, 2008.

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 animal. *Brit. J. Nutr.*, 47:417-31, 1982.

Bispo, K. T. C.; Duarte, F. G.; Campello, M. C.; Vieira, L. A.; Silva, D. A. R. & Rego, M. A. V. Tendência da mortalidade por desnutrição em crianças menores de quatro anos de idade no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, 79:48-51, 2010.

Brameld, J. M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *Brit. J. Nutr.*, 91:327-28, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar*. Brasília: 2005. Disponível em: http://www.opas.org.br/familia/UploadArq/desnutricao_grave.pdf. Acesso em: 18/12/2011.

Cabeço, L. C. Caracterização morfológica, expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e dos receptores nicotínicos (NACHRS) no músculo estriado de ratos submetidos a restrição proteica materna. *Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada)* - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Botucatu, 2011. p.95.

Carvalho, S. C.; Cabeço, L. C.; Souza, P. A. T.; Boer, P. A.; Dal-Pai Silva, M. & Matheus, S. M. M. Caracterização morfológica das junções neuromusculares de ratos adultos submetidos à restrição proteica materna. 17 Simpósio Internacional de Iniciação Científica. Ribeirão Preto, *Anais SIIC*, 2009.

Cotran, R. S.; Kumar, V. & Robbins, S. T. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005. p.1277.

Fahey, A. J.; Brameld, J. M.; Parr, T. & Buttery, P. J. The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J. Anim. Sci*, 83:2564-71, 2005.

Harding, J. E. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *International Journal of Epidemiology*, 30:15-23, 2001.

Junqueira, L. C. U. & Junqueira, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1 ed. São Paulo, 1983. p.123.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27:137-38, 1965.

Lehrer, G. M. & Ornstein, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophys. Biochem. Cytol.*, 6:399-419, 1959.

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

Marcondes, E.; Vaz, F.A.; Ramos, J.L. A. *Pediatria Básica: Pediatria Clínica Especializada*. Tomo III. Editora Sarvier, 2008.

Nascimento, O. J.; Madi, K.; Silva, J. B. G; Filho, P. J. S.; Hahn, M. D.; Couto, B. & Freitas, M. R. G. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição proteica estudo experimental, em ratos albinos. *Arq. Neuropsiquiat.*, 48:395-402, 1990.

Oliveira, F. L.; Oliveira, A. S.; Schimidt, B. & Amâncio, O. M. Desnutrição energética intrauterina em ratos: alterações musculoesqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *J. Pediatr.*, 75:350-56, 1999.

Organização das Nações Unidas (ONU). *Relatório da Organização Mundial da Saúde coloca a desnutrição entre as principais causas de morte no planeta*. 2010. Disponível em: www.onu.org. Acesso em 25/01/2012.

Osmo, H. A. Alterações metabólicas e nutricionais em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, 22:328-35, 2007.

Oumi, M.; Miyoshi, M. & Yamamoto, T. The ultrastructure of skeletal and smooth muscle in experimental protein malnutrition in rats fed a low protein diet. *Arch. Histol. Cytol.*, v. 63, p. 451-457, 2000.

Sarnat, H. B. Developmental disorders of muscle. In: Mastaglia, F. L. & Walton, S. J., eds. *Skeletal Muscle Pathology*. New York, Churchill Livingstone, 1982. pp.140-60.

Silvado, C. E. & Werneck, L. C. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve* 34:72-77, 2006.

Torun, B. & Chew, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.) *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea & Febiger, 2:950-76, 1994.

Toscano, A. E.; Manhães-de-Castro, R. & Canon, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*, 24:270-278, 2008.

Ventrucci, G.; Silva, L. G. R.; Mello, M. A. R. & Marcondes, M. C. G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. *Nutrition*, 20:213-217, 2004.

Yan, X.; Zhu, M. J.; Dodson, M. V. & Du, M. Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development. *Journal of Genomics*,1:29-38, 2012.

Zhu, M. J.; Ford, S. P.; Warrie, J.; Means, W. J.; Hess, B. W.; Nathanielszand, P. W. & Du, M. maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol*,15: 241-50, 2006.

FIGURAS

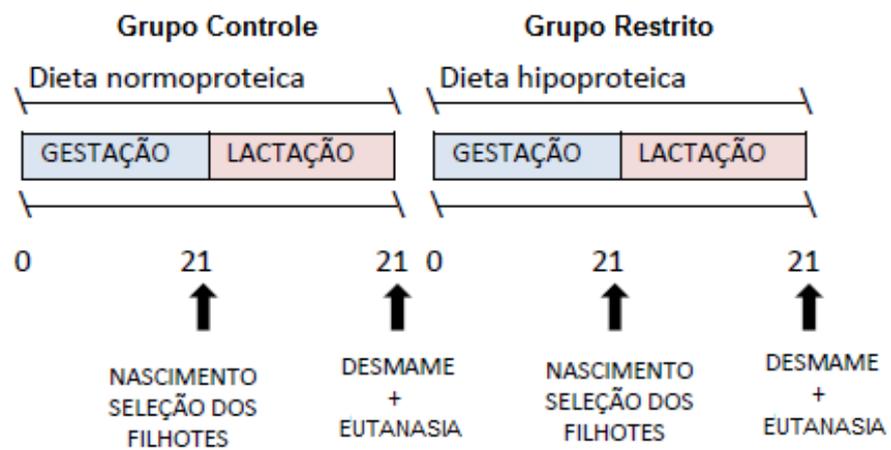


Fig. 1- Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos estudados.

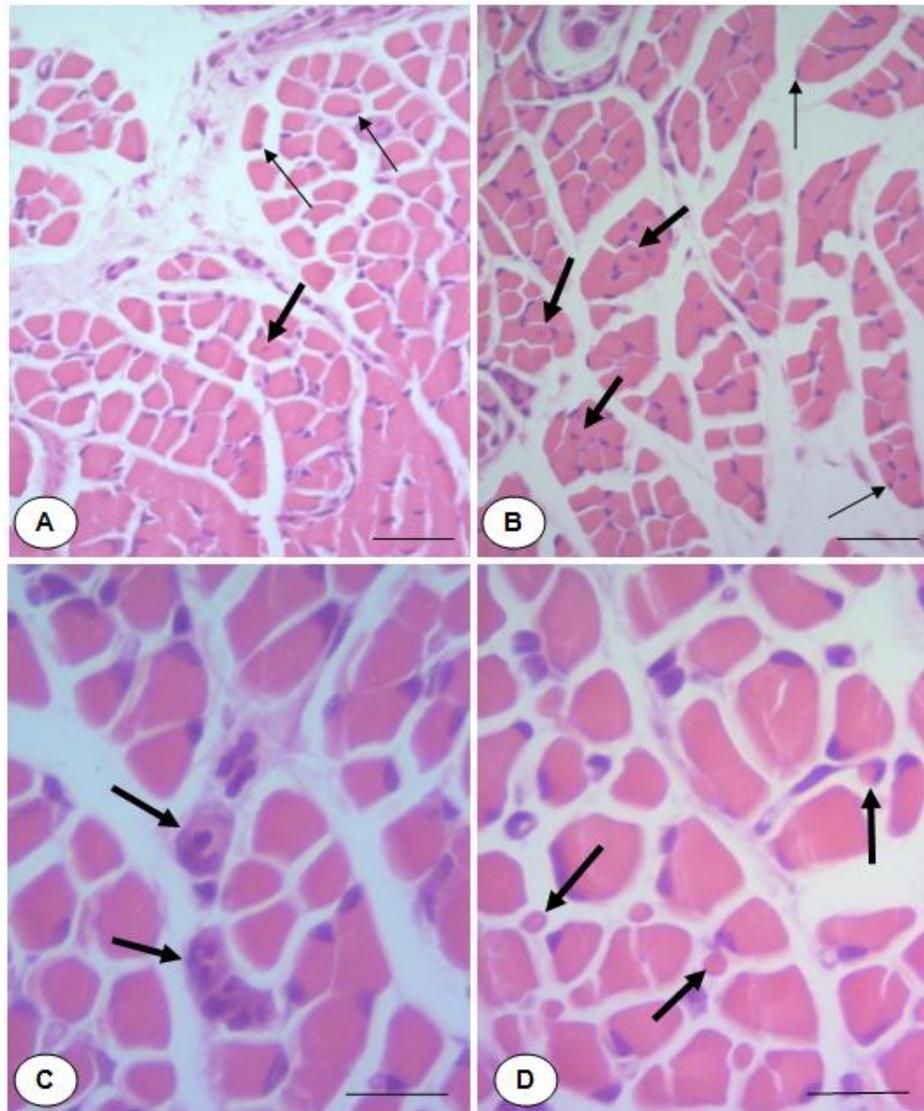


Fig. 2- Fotomicrografias de secções transversais do músculo EDL de ratos. HE. **A:** Grupo controle. Presença de núcleo central (seta espessa); núcleos periféricos (setas finas). Barra = 20 μm **B:** Grupo restrito. Notar presença de núcleos centrais (setas espessas) e núcleos periféricos (setas finas). Barra = 20 μm . **C:** Grupo restrito. Presença de miotubo (setas espessas). Barra = 10 μm . **D:** Grupo restrito. Fibras fetais (setas espessas). Barra = 10 μm .

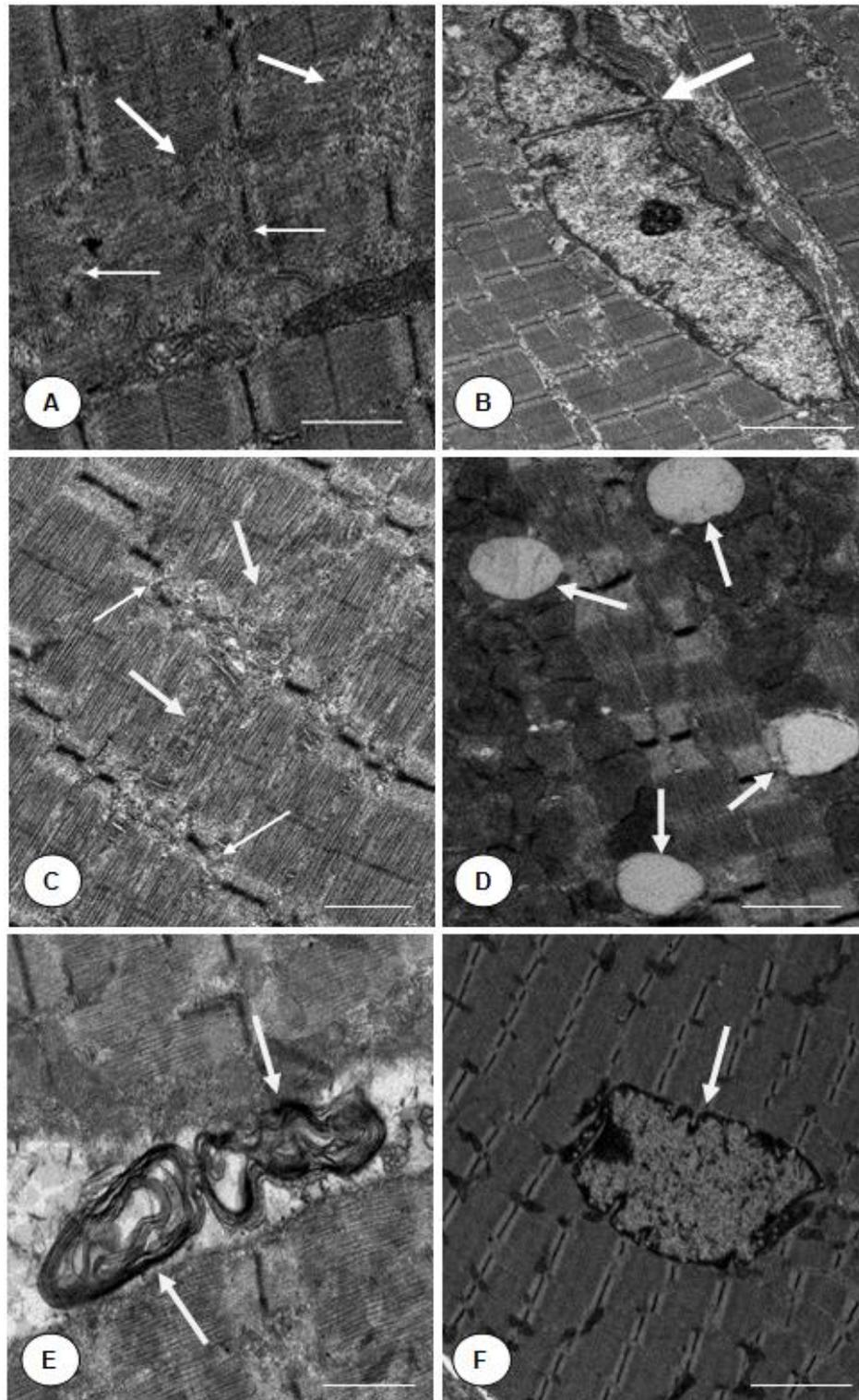


Fig. 3- Eletromicrografias de transmissão do músculo EDL de rato com 21 dias de idade em corte longitudinal. **A:** Grupo controle. Observar as fibras musculares com foco de miofibrilas rarefeitas ou frouxamente arranjadas (setas espessas) e linha Z desorganizada (setas finas). Barra = 500 nm. **B:** Grupo restrito. Miofibrilas rarefeitas ou frouxamente arranjadas (setas espessas) e linha Z desorganizada (setas finas). Barra = 1 μ m. **C:** Grupo controle. Núcleo fragmentado (seta espessa). Barra = 2 μ m. **D:** Grupo restrito. Núcleo central (seta espessa). Barra = 2 μ m. **E:** Grupo restrito. Notar a presença de grande quantidade de gotículas de lipídios (setas espessas). Barra = 1 μ m. **F:** Grupo restrito. Presença de figuras de mielina (seta espessa). Barra = 1 μ m.

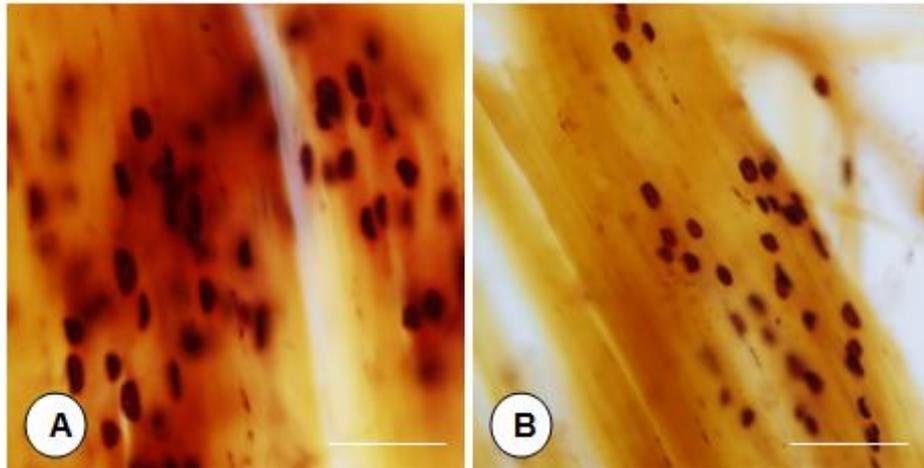


Fig. 4- Fotomicrografias do músculo EDL de rato após reação para Esterase Inespecífica. **A:** Grupo controle e **B:** Grupo restrito. Observar o polimorfismo das JNMs entre os grupos estudados. Barra = 100 μ m.

TABELAS

Tabela I - Composição da ração fornecida aos animais no período gestacional e de lactação.

Componentes*	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)**	202,00	71,50
Amido de Milho	397,00	480,00
Dextrina	130,50	159,00
Sacarose	100,00	121,00
Óleo de Soja	70,00	70,00
Fibra (microcelulose)	50,00	50,00
Mistura de Minerais ***	35,00	35,00
Mistura de Vitaminas ***	10,00	10,00
L - cistina	3,00	1,00
Cloreto de Colina	2,50	2,50

*Dieta para a fase de gestação em roedores - AIN-93G

** Valores corrigidos de acordo com o conteúdo de proteína na caseína

*** Segundo AIN-93G

Tabela II - Peso corpóreo, peso das GV e GE, peso e comprimento do músculo dos animais dos grupos controle e submetidos à restrição proteica.

	GRUPOS	
	CONTROLE	RESTRITO
Peso Corpóreo	48,650 ± 6,874	21,910 ± 3,588***
Peso das GV e GE	0,539 ± 0,084	0,164 ± 0,035***
Peso do Músculo	0,015 ± 0,004	0,004 ± 0,002***
Comprimento do Músculo	10,790 ± 1,128	7,785 ± 0,814***

Valores expressos em média ± desvio padrão. Representam significância estatística **p<0,01 e

***p<0,001.

Tabela III - Área, diâmetro maior e diâmetro menor das JNMs de ratos dos grupos controle e submetidos à restrição proteica.

GRUPOS		
	Controle	Restrito
Área (μm^2)	199,9 \pm 88,0	116,4 \pm 42,3***
Diâmetro Maior (μm)	21,8 \pm 5,1	17,3 \pm 3,7***
Diâmetro Menor (μm)	10,9 \pm 2,9	8,4 \pm 2,1***

Valores expressos através da média \pm desvio padrão. ***Representa significância estatística ($p < 0,001$).

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Estudo morfológico e morfométrico das junções neuromusculares e fibras musculares do músculo extensor longo dos dedos de ratos idosos submetidos à restrição proteica materna

Estudo morfológico e morfométrico das fibras musculares e junções neuromusculares do músculo extensor longo dos dedos de ratos idosos submetidos à restrição proteica materna

Jeronimo, L.C.¹; Confortim, H.D.¹; Centenaro, L.A.¹; Matheus, S.M.M.²; Pinheiro, P.F.F.²; Torrejais, M.M.³

¹Programa de Mestrado em Biociências e Saúde - UNIOESTE - Cascavel - Paraná - Brasil

²Departamento de Anatomia - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu - São Paulo - Brasil

³Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - UNIOESTE - Cascavel - Paraná - Brasil

RESUMO

A restrição proteica implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos, entre eles, o músculo estriado esquelético, por ser um reservatório de proteína no organismo. Desse modo, o presente trabalho buscou analisar as características morfológicas, morfométricas das fibras musculares e junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos aos 365 dias de idade, submetidos à restrição proteica materna durante os períodos de gestação e lactação. Ratos *Wistar* foram separados em dois grupos: Grupo controle - mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração normoproteica (17% de proteína) e Grupo restrito - mães alimentadas durante a gestação e lactação com ração hipoproteica (6% de proteína). Os filhotes foram mantidos com a mãe durante todo o período de lactação (21 dias) e, após este período a prole recebeu ração normoproteica até os 365 dias de idade. Foi realizado estudo histológico (HE) e histoenzimológico (NADH-TR) das fibras musculares. Para a marcação das JNMs, o músculo foi submetido à reação Esterase Inespecífica. A análise histológica das fibras musculares nos animais do grupo restrito mostrou a presença de núcleos centralizados e uma diminuição da área no grupo restrito. No estudo histoenzimológico o músculo EDL apresentou uma distribuição aleatória dos diferentes tipos de fibras musculares e a área das fibras musculares do tipo IIa foi menor no grupo restrito. Em relação ao estudo ultraestrutural, nos animais do grupo restrito observou-se desorganização da linha Z, presença de gotículas de lipídios e vacúolos que abrigavam figuras de mielina nas regiões subsarcolemal e intramiofibrilar. Na análise das JNMs não teve diferença significativa. A restrição proteica imposta no período de gestação e lactação pode ter afetado o desenvolvimento do músculo esquelético, produzindo déficit permanente nas fibras musculares no músculo EDL da prole.

PALAVRAS-CHAVE: morfologia; morfometria; restrição proteica; músculo extensor longo dos dedos; rato.

INTRODUÇÃO

A desnutrição energética proteica (DEP) é um problema multinutricional secundário à deficiência de um ou mais nutrientes essenciais, caracterizada por distúrbios clínicos causados por vários graus de deficiência (Colembegue & Conde, 2011).

A terceira idade é um grupo etário atingido por doenças crônicas não transmissíveis, que muitas vezes apresentam importante relação com a ingestão alimentar. Estudo realizado por Abreu *et al.* (2008), mostrou uma situação alimentar preocupante nos idosos, pois quase todos apresentaram baixa ingestão energética e alta prevalência de um consumo inadequado de proteínas, vitaminas e minerais. A deficiência de um ou mais nutrientes essenciais, está associada ao aumento da mortalidade e da susceptibilidade às infecções, levando a uma redução da qualidade de vida do idoso (Otero *et al.*, 2002; Rezende *et al.*, 2010). Os fatores que interferiram negativamente na ingestão de energia foram a baixa renda, isolamento, uso de medicamentos e o sedentarismo. A DEP é vista, erroneamente, como parte do processo normal de envelhecimento, sendo com frequência ignorada. Os óbitos por desnutrição em idosos surgem mais como causa associada do que como causa básica (Otero *et al.*, 2002).

A desnutrição implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos, entre eles, o músculo estriado esquelético (Osimo, 2007). O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição proteica por ser um reservatório de proteína no organismo. Portanto, quando há um déficit proteico na dieta, esse tecido torna-se alvo de depleção, ocasionando alterações nas fases de crescimento, funcionamento e diferenciação das fibras musculares (Brameld, 2004).

Com base no que foi apresentado, há poucos relatos na literatura de estudos em animais roedores idosos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características morfológicas e morfométricas das fibras musculares e junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos aos 365 dias de idade, submetidos à restrição proteica materna durante os períodos de gestação e lactação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, do gênero masculino e feminino, proveniente do Biotério do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP - *Campus* de Botucatu, mantidos sob condições padrão de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas), temperatura em torno de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) para "Programação fetal por restrição proteica materna em ratos machos", com o certificado de protocolo nº 264-CEEA (Anexo A).

Acasalamento dos animais

No início do experimento, duas fêmeas e um macho, em idade reprodutiva (12 semanas), foram alojados em caixas maternidade durante a noite para o pareamento. Com o objetivo de verificar presença de espermatozóides, nas manhãs que sucederam o pareamento o macho foi retirado da caixa para que o esfregaço vaginal nas fêmeas fosse realizado. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal marcou o dia 0 da gestação. Após a detecção da prenhez as fêmeas foram transferidas para caixas individuais.

No dia do nascimento, a prole foi pesada e foram mantidos oito filhotes por rata-mãe durante a lactação, para manter a disponibilidade de alimento igualitária entre todos os filhotes. Os filhotes foram mantidos com a mãe durante o período de lactação (21 dias). Após o desmame, ratos machos receberam dieta sólida padrão para roedores até a idade de 365 dias (Figura 1).

Grupos Experimentais

Grupo Controle: prole de mães alimentadas durante o período de gestação e lactação com ração normoproteica (17%), após este período foram alimentados com ração padrão (normoproteicas) para roedores até a idade de 365 dias ($n = 5$).

Grupo Restrito: prole de mães alimentadas durante o período de gestação e lactação com ração hipoproteica (6%), após este período foram alimentados com ração padrão (normoproteicas) para roedores até a idade de 365 dias ($n = 8$).

Alimentação e água foram ofertadas *ad libitum* para ambos os grupos durante todo o experimento. As dietas eram isocalóricas e suas composições estão representadas na tabela I.

Eutanásia dos animais

Os ratos foram desensibilizados em uma câmara de CO₂ e posteriormente pesados e realizado a eutanásia por decaptação em guilhotina. Em seguida, o animal foi posicionado na mesa de cirurgia, para realização da dissecação do músculo extensor longo dos dedos (EDL). A pele e o músculo tibial anterior foram rebatidos, dos antímeros direito e esquerdo dos membros pélvicos, para a remoção do músculo EDL. Após a retirada, o músculo foi pesado e medido com auxílio de um paquímetro digital (Digimess[®], São Paulo, Brasil). O antímero direito foi coletado para o estudo histológico; o antímero esquerdo foi seccionado para o estudo histoquímico das JNMs e análise ultraestrutural das fibras musculares. Em seguida, foram coletadas e pesadas as gorduras visceral (GV), retroperitoneal (GR) e epididimal (GE)

Estudo Histológico e Morfométrico das Fibras Musculares

Para o estudo histológico das fibras musculares fragmentos do músculo EDL foram retirados e fixados em Karnovsky (1965) (2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M). Após a fixação, esses fragmentos foram lavados em tampão PBS, para retirada do excesso de fixador. Posteriormente o material foi submetido à inclusão em Paraplast. A inclusão do músculo foi realizada na posição vertical, para posterior secção do mesmo em corte transversal, com o auxílio de uma central de inclusão (EasyPath Cygni[®], São Paulo, Brasil). As amostras do músculo foram seccionadas a cinco µm de espessura em um micrótomo (RM2165, Leica[®], Wetzlar, Alemanha). Os cortes obtidos foram montados em lâminas previamente silanizadas e submetidos a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para observação da morfologia geral das fibras musculares (Junqueira & Junqueira, 1983).

As análises morfométricas das fibras musculares foram realizadas através da mensurações da área de secções transversais do músculo EDL de ratos, preparadas a partir do estudo histológico. Foram quantificados os núcleos e fibras musculares e realizada a mensuração da área de cada fibra muscular. Para cada animal dos grupos controle e restrito foram escolhidos aleatoriamente 20 campos, a partir de imagens que foram capturadas com objetiva de 40x, em fotomicroscópio Zeiss - Primo Star, acoplado com câmara AxioCam ERc5s, com auxílio do programa AxioVision Rel.4.8. Este material foi analisado através do software Image-Pro Plus 6.0.

Estudo Histoenzimológico dos Diferentes Tipos de Fibras Musculares

Para o estudo histoenzimológico das fibras musculares, o músculo EDL foi dissecado e mantido à temperatura ambiente durante 30 - 40 minutos. Após este tempo, as amostras foram cobertas com talco neutro para a preservação do tecido, congelados em nitrogênio líquido durante dois minutos e armazenados no Biofreezer a -80°C. Os segmentos musculares congelados foram transferidos para câmara de criostato a -20°C e mantidos durante 30 minutos. Em seguida, esses segmentos tiveram uma de suas extremidades colada a um suporte metálico, com Tissue Freezing Medium (Leica[®], Nussloch, Alemanha). Os músculos foram seccionados transversalmente (sete µm de espessura) e os cortes obtidos foram submetidos à reação com Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase - (NADH-TR), conforme técnica de Pearse (1972) modificada por Dubowitz & Brooke (1973).

As observações microscópicas e a fotodocumentação foram conduzidas em fotomicroscópio Zeiss - Primo Star, acoplado com câmera AxioCam ERc5s, com auxílio do programa AxioVision Rel.4.8 (Zeiss[®], Microimaging Inc., Alemanha).

Foram realizadas mensurações da quantidade e da área de secção transversa de cada tipo de fibra muscular presente no músculo EDL de ratos, a partir do estudo histoenzimológico. Para cada animal dos grupos controle e restrito, foram escolhidos aleatoriamente três campos, a partir de imagens que foram capturadas com objetiva de 20x, em fotomicroscópio (Primo Star, Zeiss[®], Oberkochen, Alemanha), acoplado em câmera (AxioCam ERc5s, Zeiss[®], Göttingen, Alemanha), com auxílio do programa AxioVision Rel.4.8. Este material foi analisado através do software Image-Pro Plus 6.0.

Estudo em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo ultraestrutural, os músculos foram removidos e reduzidos a fragmentos longitudinais (aproximadamente 1 mm de largura), fixados em solução de Karnovsky e submetidos à técnica de MET. Para a preparação da técnica, as amostras foram retiradas do fixador e lavadas em tampão fosfato 0,1M pH7,3. Em seguida, o material foi imerso em tetróxido de ósmio por duas horas e lavado em água destilada. Após a lavagem, o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% em água destilada por cerca de 2 horas e posteriormente foi realizado a desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e por fim o emblocamento. Após a emblocagem, o material foi seccionado em cortes ultrafinos

(aproximadamente 90nm). Os cortes foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50%, por cerca de 20 minutos e com citrato de chumbo por 10 minutos.

O material foi fotografado em microscópio eletrônico de transmissão (CM100, Philips, Eindhoven, Holanda).

Estudo das Junções Neuromusculares (JNMs)

Fragmento do músculo EDL foi removido e fixado em solução de Karnovsky (1965), mantidos em temperatura ambiente e cortado longitudinalmente em três ou quatro fatias com lâminas de inox. Os cortes obtidos foram posteriormente submetidos à reação Esterase Inespecífica (Lehrer & Ornstein, 1959).

As observações microscópicas e a fotodocumentação foram conduzidas em fotomicroscópio Olympus Bx60, e câmera Olympus DP71, com auxílio do programa DP Controler 3.2.1 276.

Para o estudo morfométrico das JNMs foram utilizadas duas lâminas para cada animal. Em cada animal estudado, foram tomadas medidas da área, diâmetro maior e menor de 50 JNMs. As imagens foram capturadas com a objetiva de 20X, em fotomicroscópio (Olympus BX-60, Tóquio, Japão), com câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), com auxílio do programa DP Controler 3.2.1 276. As mensurações foram realizadas através do software Image-Pro Plus 6.0. (Media Cybernetics, Maryland, USA)

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados referentes ao peso corpóreo, peso e comprimento do músculo, peso do tecido adiposo, além da área, diâmetro maior e menor das JNMs foram comparados utilizando o teste t de *Student*. O teste não-paramétrico de *Mann Whitney* foi utilizado quando os resultados não assumiram a distribuição Gaussiana.

RESULTADOS

Peso Corpóreo e Peso das GV, GR e GE

A tabela II mostra os dados referentes ao peso corpóreo e peso das GV, GR e GE os quais foram expressos através da média e desvio padrão. Os resultados

mostraram uma redução do peso corpóreo e peso das GV, GR e GE nos animais do grupo restrito quando comparados aos animais do grupo controle.

Peso e Comprimento do Músculo EDL

Os dados relativos ao peso e comprimento do músculo EDL, foram expressos através da média e desvio padrão (Tabela II). Os resultados mostraram que houve redução no peso do músculo no grupo restrito quando comparado com o grupo controle. Em relação ao comprimento do músculo, o grupo restrito apresentou um comprimento menor do que os animais do grupo controle.

Estudo Morfológico das Fibras Musculares

Nos animais do grupo controle as fibras musculares esqueléticas apresentaram arquitetura geral preservada; organizadas em fascículos circundados por tecido conjuntivo de aspecto normal (perimísio). Cada fibra apresentava um aspecto poligonal ou arredondado, com núcleos periféricos, envoltas por tecido conjuntivo (endomísio) (Fig. 2A). Nos animais do grupo restrito, as fibras musculares mostraram-se com aspecto semelhante ao grupo controle, porém observou-se presença de vários núcleos em posição central (Fig.2B).

Os resultados referentes a área da fibra muscular, número de fibras e número de núcleos dos animais do grupo controle e restrito estão representados na tabela III. A análise da área mostrou uma diminuição significativa no grupo restrito quando comparado com o grupo controle.

Estudo Histoenzimológico e Morfométrico das Fibras Musculares

A reação para demonstrar a atividade do NADH-TR evidenciou a presença de fibras musculares tipo I (diâmetro pequeno e intensa atividade oxidativa); fibras musculares tipo IIa (diâmetro intermediário e moderada atividade oxidativa) e fibras musculares tipo IIb (diâmetro grande e fraca atividade oxidativa). Essas reações mostram que o músculo EDL apresentou uma distribuição aleatória dos diferentes tipos de fibras musculares (Figs. 2C e 2D).

Os resultados referentes a área das fibras musculares nos animais dos grupos controle e restrito estão representados na tabela IV. A área das fibras musculares do tipo IIa foi estatisticamente menor no grupo restrito quando

comparada ao grupo controle. Em relação à contagem de fibras, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela IV).

Estudo Ultraestrutural das Fibras Musculares

Nos animais controles, dois tipos de fibras musculares foram identificados. Fibras do tipo I apresentaram linha Z larga e densa, linha M, banda A, I e H bem evidentes. Mitocôndrias formavam cadeias intermiofibrilares, além de estarem presentes nos sarcômeros e em agregados subsarcolemais. Estas fibras apresentam metabolismo oxidativo, são resistentes à fadiga e se contraem mais lentamente (Fig. 3A).

Outro tipo de fibra muscular encontrado foi o tipo II, que apresentou linha Z delgada, linha M e banda A, I e H evidentes. As mitocôndrias sempre dispostas aos pares, de cada lado da linha Z e banda I, eram menores e não formavam agregados ou colunas. Estas fibras musculares apresentam metabolismo glicolítico, são pouco resistentes à fadiga e têm contração rápida (Fig. 3B).

Já nos animais do grupo restrito foi observada uma desorganização da linha Z (Fig. 3C) em várias regiões e alguns focos com desorganização das miofibrilas. Notou-se a presença de poucas gotículas de lipídios (Fig. 3D) e figuras de mielina. Alguns núcleos celulares apresentaram-se fragmentados.

Análise Morfológica e Morfométrica das Junções Neuromusculares

As JNMs presentes no músculo EDL nos grupos estudados apresentaram morfologia clássica do tipo placa, formato oval, redondo ou elíptico. Variações da forma como junções abertas, formatos irregulares ou compactos. Foram observadas e caracterizam o polimorfismo dessas estruturas visto em diversos músculos (Figs. 4A e 4B)

Os resultados da análise da área, diâmetro maior e diâmetro menor das JNMs estão representados na tabela V. A área, o diâmetro maior e diâmetro menor não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados.

DISCUSSÃO

O peso corpóreo dos animais do grupo restrito foi menor quando comparado ao grupo controle. De acordo com Torun & Chew (1994), a diminuição do peso

corpóreo é um parâmetro clínico que caracteriza a DEP. Estudos da literatura, utilizando ratos (Almeida & Mello, 2004; Toscano *et al.*, 2008), também encontraram um menor peso na prole de mães que foram submetidas à restrição protéica durante a gestação e/ou gestação e lactação. Porém, há relatos que contradizem esses resultados, onde os animais submetidos à restrição proteica não apresentaram diferenças significantes no peso corpóreo (Oliveira *et al.*, 1999; Cabeço, 2011). Essas divergências podem estar relacionadas com o tempo de duração da restrição proteica, o tipo de dieta e a idade dos animais.

A dieta utilizada neste trabalho afetou o peso corpóreo dos animais mesmo após a mudança de ração após o desmame (ração normoproteica - 17%) e o *déficit* manteve-se no animal adulto.

Neste experimento observou-se redução do peso do músculo EDL nos animais do grupo restrito. Esse dado está de acordo com descrições da literatura (Toscano *et al.*, 2008) onde a restrição proteica materna durante a gestação e lactação afetou o desenvolvimento do músculo esquelético da prole à longo prazo. Bedi *et al.* (1982) relataram que a restrição energética protéica quando ocorre após o período de lactação pode ser recuperada com a normalização do estado nutricional, mas as alterações provocadas pela restrição energética protéica ocorridas no período da gestação e lactação, podem causar déficit permanente. Assim, acredita-se que a dieta normoproteica (17% de proteína) ofertada à prole após o período de lactação até a idade adulta não foi suficiente para a recuperação do peso muscular. Ratos desnutridos durante a gestação e lactação, tiveram uma redução do peso no músculo tibial anterior (Ventrucci *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). Apesar de ser um músculo diferente, é um músculo de contração rápida semelhante ao músculo utilizado no presente estudo. A redução do peso muscular provavelmente ocorreu devido a perda de proteínas teciduais (Alves *et al.*, 2008). Por outro lado, Cabeço (2011), utilizando o mesmo protocolo de dieta, porém com restrição proteica apenas na fase gestacional, não observou diferenças no peso do músculo EDL nos períodos de 30 dias e 16 semanas de idade. Essa alteração do peso em relação ao presente estudo, pode ter sido desencadeada pela quantidade de proteínas ofertada a prole no período de lactação e após o desmame, sendo suficiente para recuperar o peso do músculo EDL.

No estudo morfológico das fibras musculares foi observado a presença de vários núcleos em posição central, sendo que a migração do núcleo para o centro da

fibra muscular é evento comum em patologias musculares. No presente estudo, a presença de núcleos centralizados nos animais restritos, pode ter relação com o período de restrição proteica que ocorreu em fase crítica de desenvolvimento do tecido muscular.

A análise morfométrica das fibras musculares no estudo histológico mostrou diminuição significativa da área em todas as fibras nos animais do grupo restrito quando comparado ao grupo controle. Outros estudos realizados com ratos submetidos à restrição proteica também relataram diminuição da área em todos os tipos de fibras (Haltia *et al.*, 1978; Nascimento *et al.*, 1990; Silvado & Werneck, 2006; Yan *et al.*, 2012). A literatura descreve que a restrição proteica pode causar um maior comprometimento na área das fibras tipo II do que nas fibras tipo I (Bedi *et al.*, 1982; Oldfors & Patrick, 1986; Chopra *et al.*, 1987; Wilson & Harris, 1988; Dwyer & Stickland, 1992; Oliveira *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2008). Neste trabalho o estudo histoenzimológico mostrou uma diminuição da área nos três tipos de fibras, porém apenas nas fibras do tipo IIa foi significativo. Esta diminuição pode estar relacionada com a diminuição do peso corpóreo e peso do músculo do animal, sugerindo que a restrição proteica imposta no período de gestação e lactação promove alterações permanentes na área e frequência das fibras musculares (Bedi *et al.*, 1982; Ozanne, 2003).

Em relação ao número de núcleos e fibras musculares, foram maiores no grupo restrito quando comparado com seu respectivo grupo controle, porém essas diferenças não foram significativas. A literatura mostra resultados divergentes (Bayol *et al.*, 2004), não observaram nenhum efeito da restrição materna no número de fibras no músculo semitendíneo de ratos, porém houve uma redução do número de núcleos no grupo restrito, indicando uma redução na proliferação das células do músculo. Provavelmente, o aumento do número de núcleos e número de fibras do presente trabalho esta relacionado com a diminuição da área das fibras que foi significativa.

Na análise da ultraestrutura das fibras musculares, nos animais do grupo restrito foi observado algumas alterações, como desorganização da linha Z e das miofibrilas, presença de poucas gotículas de lipídios. Aos 365 dias, a literatura não descreve estudos sobre esse assunto, provavelmente isso ocorreu como consequência dos efeitos da restrição proteica durante os períodos de gestação e lactação da prole.

Em relação a análise da área, diâmetros maior e menor das JNMs não houve alteração significativa desses parâmetros quando comparado os grupos estudados. Esse resultado provavelmente ocorreu devido ao polimorfismo das JNMs no músculo EDL.

A análise dos resultados apresentados neste trabalho e sua avaliação permitiram as seguintes conclusões: a) A diminuição do peso corpóreo nos animais restritos pode estar relacionada com restrição proteica materna, que pode ter afetado o crescimento e desenvolvimento fetal, pois mesmo com a mudança da dieta até os 365 dias de idade, o déficit se manteve; b) As alterações no peso do músculo EDL nos animais do grupo restrito podem ter sido desencadeadas pela quantidade de proteína ofertada aos animais no período gestacional e de lactação, sendo suficiente para afetar o desenvolvimento do músculo da prole com consequências a longo prazo, pois a oferta de dieta normoproteica até os 365 dias de idade não foi suficiente para a recuperação do peso muscular; c) A restrição proteica materna pode ter produzido um déficit permanente nas fibras musculares da prole, quando observado ao microscópio de luz; d) As alterações ultraestruturais encontradas nas fibras musculares nos animais restritos podem ser devido a restrição proteica materna.

REFERÊNCIAS

- Abreu, W. C.; Franceschini, S. C. C.; Tinoco, A. L. A.; Pereira, C. A. S. & Silva, M. M. S. Inadequação no consumo alimentar e fatores interferentes na ingestão energética de idosos matriculados no programa municipal da terceira idade de viçosa (MG). *Rev. Baiana Saúde Pública*, 32:190-202, 2008.
- Almeida, P. B. L. & Mello, M. A. R. Desnutrição proteica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Rev. Bras. Ed. Fís. Esp.*, 18:17-30, 2004.
- Alves, A. P.; Dâmaso, A. R. & Dal Pai, V.†. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J. Pediatr*, 84:264-71, 2008.
- Bayol, S.; Jones, D.; Goldspink, G. & Stickland, N. C. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *British Journal of Nutrition*, 91:331-39, 2004.

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 animal. *Brit. J. Nutr.*, 47:417-31, 1982.

Brameld, J. M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *Brit. J. Nutr.*, 91:327-28, 2004.

Cabeço, L. C. Caracterização morfológica, expressão dos fatores de regulação mio gênica (MRFs) e dos receptores nicotínicos (NACHRS) no músculo estriado de ratos submetidos a restrição proteica materna. *Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada)* - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Botucatu, 2011. p.95.

Chopra, J. S.; Mehta, J.; Rana, S. V.; Dhand, U. K. & Mehta, S. Muscle involvement during postnatal protein calorie malnutrition and recovery in rhesus monkeys. *Acta Neurol*, 75:234-43, 1987.

Colembergue, J. P. & Conde, S. R. Use of the Mini Nutritional Assessment in institutionalized elderly. *Scientia Medica*, 21:59-63, 2011.

Dwyer, C. M. & Stickland, N. C. Does the anatomical location of a muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *J. Anal.*, 181:373-376, 1992.

Dubowitz, V. & Brooke, M. *Muscle biopsy: a modern approach*. London, Saunders, 1973. p.475.

Haltia, M.; Belin, O.; Schucht, H. & Sourander, P. Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibers in normal and undernourished rats. *J. Neurol. Sciences*, 36:25-39, 1978.

Junqueira, L. C. U. & Junqueira, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1 ed. São Paulo, 1983. p.123.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27:137-38, 1965.

Lehrer, G. M. & Ornstein, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophys. Biochem. Cytol.*, 6:399-419, 1959.

Nascimento, O. J.; Madi, K.; Silva, J. B. G; Filho, P. J. S.; Hahn, M. D.; Couto, B. & Freitas, M. R. G. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição proteica estudo experimental, em ratos albinos. *Arq. Neuropsiquiat.*, 48:395-402, 1990.

Oldfors, Anders & Sourander, P. Nutritional rehabilitation of skeletal muscle in protein-deprived young rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 75:173-79, 1986.

Oliveira, F. L.; Oliveira, A. S.; Schimidt, B. & Amâncio, O. M. Desnutrição energética intrauterina em ratos: alterações musculoesqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *J. Pediatr.*, 75:350-56, 1999.

- Osmo, H. A. Alterações metabólicas e nutricionais em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, 22:328-35, 2007.
- Otero, U. B.; Rozenfeld, S.; Gadelha, A. M. J. & Carvalho, M. S. Mortalidade por desnutrição em idosos, região Sudeste do Brasil, 1980-1997. *Rev Saúde Pública*, 36:141-148, 2002.
- Ozanne, S. E., Olsen, G. S., Hansen, L. L., Tingey, K. J., Nave, B. T.; Wang, C. L.; Hartil, K.; Petry, C. J.; Buckley, A. J. & Mosthaf-Seedorf, L. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J. Endocrinol.*, 177:235-41, 2003.
- Pearse, A. G. E. *Histochemistry: theoretical and applied*. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1972.
- Rezende, E. M., Sampaio, I. B. M., Ishitani, L. H, Martins, E. F. & Vilella, L. C. M. Mortality of malnourished elderly in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a multidimensional analysis focusing on multiple causes of death. *Cad. Saúde Pública*, 26:1109-1121, 2010.
- Silvado, C. E. & Werneck, L. C. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve* 34:72-77, 2006.
- Torun, B. & Chew, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.) *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea & Febiger, 2:950-76, 1994.
- Toscano, A. E.; Manhães-de-Castro, R. & Canon, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*, 24:270-278, 2008.
- Ventrucci, G.; Silva, L. G. R.; Mello, M. A. R. & Marcondes, M. C. G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. *Nutrition*, 20:213-217, 2004.
- Wilson, S. J.; Ross, J. J. & Harris, A. J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development*, 102:815-21, 1988.
- Yan, X.; Zhu, M. J.; Dodson, M. V. & Du, M. Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development. *Journal of Genomics*, 1:29-38, 2012.

FIGURAS

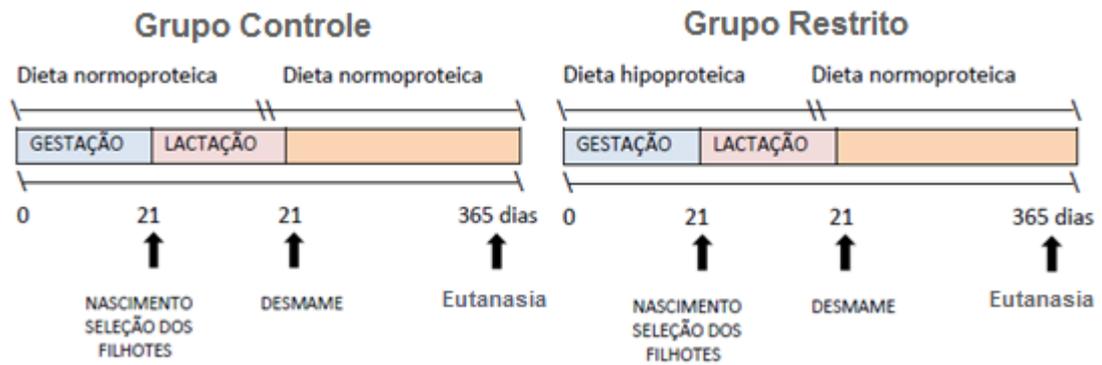


Fig. 1. Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos estudados.

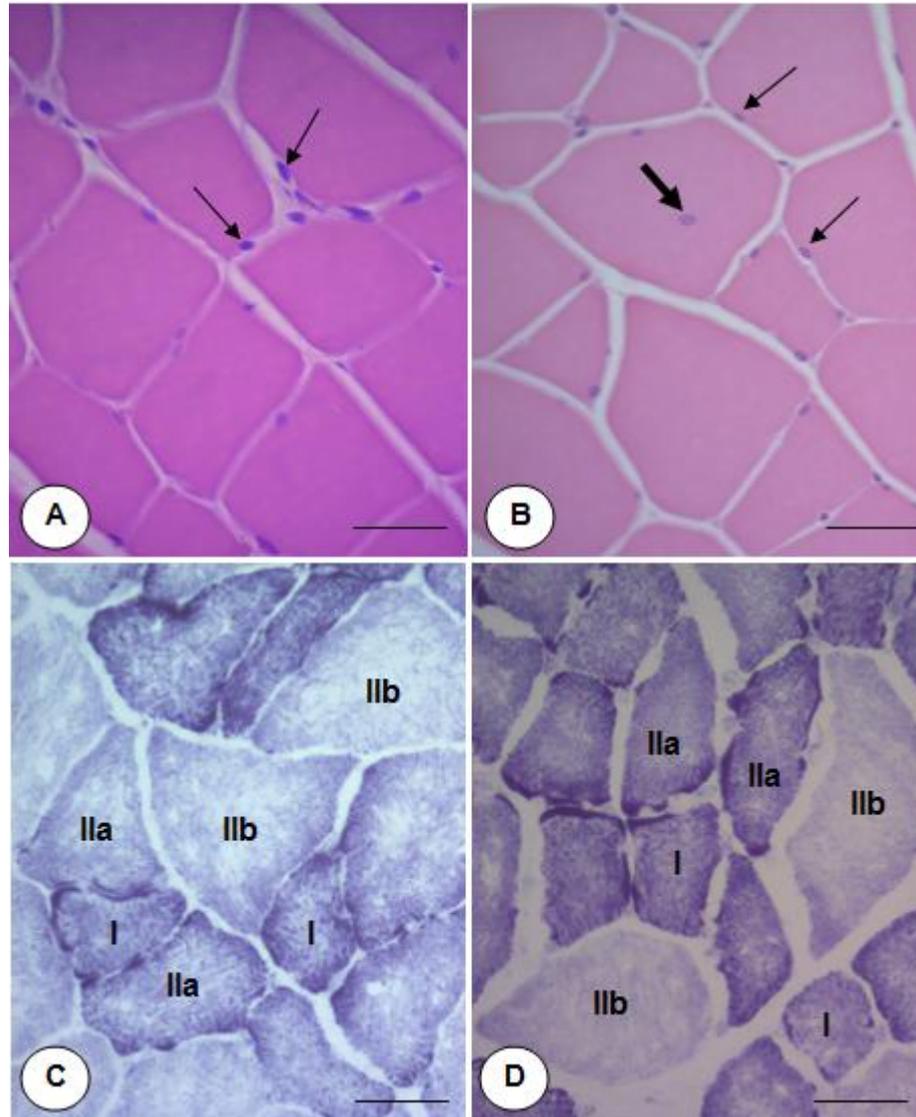


Fig. 2. Fotomicrografias de secções transversais do músculo EDL de ratos corados com HE (**A e B**) e NADH-TR (**C e D**). **A:** Grupo controle. Arquitetura geral normal; núcleos periféricos (setas finas). **B:** Grupo restrito. Notar presença de núcleo centralizado (seta espessas) e núcleos periféricos (setas finas). Barra = 20 μm . **B e C:** Grupos controle e restrito respectivamente. Fibras tipo I, IIa e IIb. Barra = 20 μm .

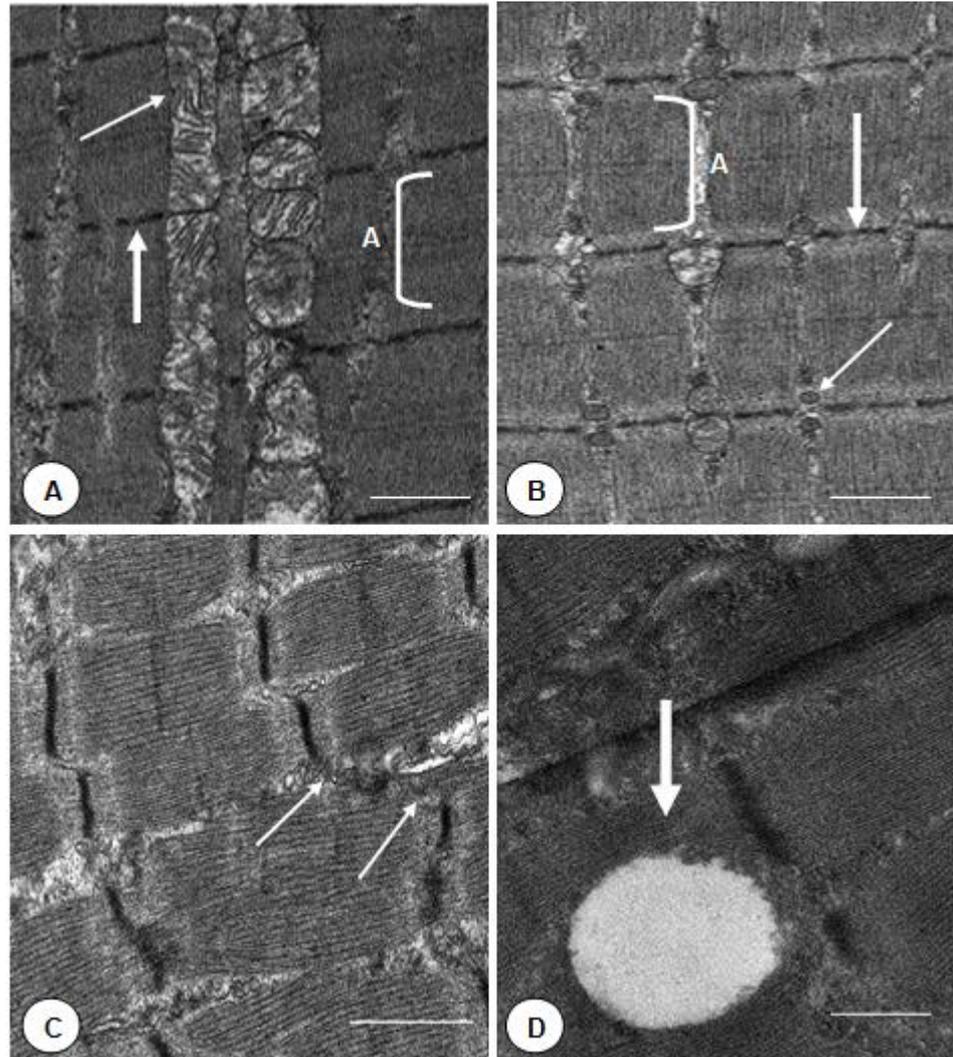


Fig. 3. Eletromicrografias de transmissão do músculo EDL de rato em corte longitudinal. **A:** Grupo controle. Fibra do tipo I, banda A (A), linha Z (seta espessa) e cadeias intermiofibrilares de mitocôndrias (seta fina). Barra = 2 μm . **B:** Grupo controle. Fibra do tipo II, banda A (A), linha Z (seta espessa) e mitocôndrias em pares, de cada lado da linha Z (seta fina). Barra = 2 μm . **C:** Grupo restrito. Observar a linha Z desorganizada (setas finas). Barra = 500 nm. **D:** Grupo restrito. Gotícula de lipídio (seta espessa). Barra = 500 nm.

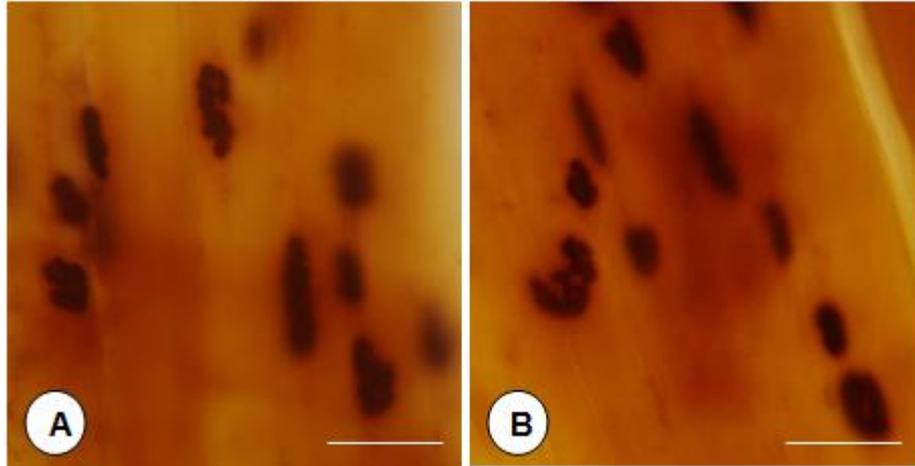


Fig. 4- Fotomicrografias do músculo EDL de rato após reação para Esterase Inespecífica. **A:** Grupo controle e **B:** Grupo restrito. Observar o polimorfismo das JNMs entre os grupos estudados. Barra = 100 μ m.

TABELAS

Tabela I - Composição da ração fornecida aos animais no período gestacional e de lactação.

Componentes*	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)**	202,00	71,50
Amido de Milho	397,00	480,00
Dextrina	130,50	159,00
Sacarose	100,00	121,00
Óleo de Soja	70,00	70,00
Fibra (microcelulose)	50,00	50,00
Mistura de Minerais ***	35,00	35,00
Mistura de Vitaminas ***	10,00	10,00
L – cistina	3,00	1,00
Cloreto de Colina	2,50	2,50

*Dieta para a fase de gestação em roedores - AIN-93G

** Valores corrigidos de acordo com o conteúdo de proteína na caseína

*** Segundo AIN-93G

Tabela II – Peso corpóreo, peso das GV, GR e GE, peso e comprimento do músculo dos animais dos grupos controle e submetidos à restrição protéica.

	CONTROLE	RESTRITO
Peso Corpóreo	563,0 ± 26,6	456,9 ± 21,5**
Peso das GV, GR e GE	5,262 ± 2,353	4,540 ± 1,605**
Peso do Músculo	0,022 ± 0,009	0,012 ± 0,004**
Comprimento do Músculo	1,519 ± 0,679	2,631 ± 0,930

Valores expressos através da média ± desvio padrão. **Representa significância estatística (p<0,001).

Tabela III - Área, número de fibras musculares e número de núcleos dos grupos controle e submetidos à restrição protéica.

	CONTROLE	RESTRITO
Área (µm²)	2086 ± 990,8	1912 ± 1009***
Nº Fibra Muscular	297,7 ± 8,50	336,4 ± 59,63
Nº Núcleos	658,3 ± 58,23	726,0 ± 110,2

Valores expressos através da média ± desvio padrão. ***Representa significância estatística (p<0,001).

Tabela IV- Área e contagem das fibras musculares dos grupos controle e submetido à restrição protéica.

	CONTROLE	RESTRITO
Área – Fibra Tipo I (μm^2)	1350 \pm 281,7	1301 \pm 243,4
Área – Fibra Tipo IIa (μm^2)	2302 \pm 406,3	2085 \pm 334,2***
Área – Fibra Tipo IIb (μm^2)	3925 \pm 726,4	3819 \pm 667,7
Contagem – Fibra Tipo I	79,2 \pm 16,5	82,0 \pm 18,5
Contagem – Fibra Tipo IIa	40,0 \pm 14,4	55,8 \pm 16,7
Contagem – Fibra Tipo IIb	73,7 \pm 6,3	65,0 \pm 15,7

Valores expressos através da média \pm desvio padrão. ***Representa significância estatística ($p < 0,001$).

Tabela V – Área, diâmetro maior e diâmetro menor das JNMs de ratos dos grupos controle e submetidos à restrição proteica.

	Controle	Restrito
Área (μm^2)	908,7 \pm 413,2	923,5 \pm 681,7
Diâmetro Maior (μm)	49,9 \pm 12,2	49,1 \pm 13,6
Diâmetro Menor (μm)	20,6 \pm 6,9	20,8 \pm 7,7

Valores expressos através da média \pm desvio padrão.

ANEXO A



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 264-CEEA, sobre "Programação fetal por restrição proteica maternal em ratos machos", sob a responsabilidade de **Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de **03/12/2010**.

Botucatu, 03 de dezembro de 2010.


Prof^ª Dr^ª **PATRÍCIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO**
Presidente - CEEA

ANEXO B

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

INTERNATIONAL
JOURNAL OF
MORPHOLOGY

Edition Vol. 30, N° 3
Published in September
of 2012
Quarterly publication

Proprietor:
Sociedad Chilena de
Anatomía

Legal Representative:
Oscar Inzunza H.

Responsible Director:
Mariano del Sol C.

Deputy Director:
Guillermo Salgado A.

Address:
Avda. Francisco Salazar
01145 • Temuco - Chile
Telephones: 325571-
325570

Fax 56-45-325600

Email:
ijmorpho@ufro.cl

Faculty of Medicine
Universidad de La Frontera
Casilla 54 - D
Temuco - Chile

Graphic Design:
Mariano del Sol C.

Printing Press
Imprenta Austral
56-45-292747

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS CONSIDERED FOR PUBLICATION

The *International Journal of Morphology* (*Revista Internacional de Morfología*), Print ISSN 0717-9367; Online ISSN 0717-9502 an official publication of the Chilean, Argentine and Pan American Societies of Anatomy. It is the continuation of *Revista Chilena de Anatomía* (*Chilean Anatomical Journal*) and is published quarterly. The four issues published yearly constitute one volume. This journal covers anatomy in all its aspects-gross, histologic and developmental, -as applied to medical practice, as well as morphological aspects of molecular, cellular, systems, or evolutionary biology. Reviews, short and brief communications and Letters to the Editor are also accepted.

All articles submitted to *International Journal of Morphology* must be original. In letters to the Editor, signed by all the authors, it should be expressly declared that all manuscripts must be approved by all authors, may not have been published previously either in whole or partly, except in abstract form, and may not be under consideration by any other journal.

Electronic submission of articles. The manuscripts can be sent by email (Text and tables in word format and figures in jpg format at 300 dpi).

Correspondence to: Dr. Mariano del Sol, Editor *International Journal of Morphology*,
Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.
Fax: 56-45-325600 Email: mdelsol@ufro.cl ijmorpho@ufro.cl

ABOUT THE FORM

Manuscripts should be as concise as possible (no more than 12 pages long, including text, illustrations, and References). Only manuscripts written in English and Spanish will be considered. They should be organized as follows: title page, running title, summary and key words, introduction, material and method, results, discussion, summary and key words in Spanish (the summary translation will be made in Chile), acknowledgments, and references. The results and discussion sections may be combined.

- Title page: should include: title, full name of author(s), institutional affiliation with complete address, running title not to exceed 45 letters and spaces, and the name, address, phone and fax number, and e-mail address of the corresponding author; if this manuscript (or grant) was subsidized, indicate the sponsorship and the number of the process at the bottom of the page.
- The summary (structured) should not exceed 300 words and should be formatted to serve in lieu of a concluding summary. It should refer concisely to the rest of the paper. Append three to five key words at the end of the summary (from the Medical Subject Heading from the *Index Medicus*).
- Text: Introduction, Material and Method, Results and Discussion.
- Tables and Illustrations: Each table must have a self-explanatory title, be numbered in order of appearance with Roman numerals, and be cited at an appropriate point in the text. Tables should present comparisons of data that are too cumbersome to describe in the text. Illustrations are numbered with Arabic numeral. Abbreviations used on figures should be defined in the legend must match exactly those used in the text. If it is necessary, use letters, numbers or transferable symbols.
- Summary and key words in English (or in Spanish, in case the article is written in English).
- Acknowledgments.
- References: text references to literature should be arranged chronologically by author's last name, following the standards of the journal's technical format. Every author should be named in the References. When there are more than two authors, use the first author's name and *et al.* When references are made to more than one paper by the same author, published in the same year, refer them to as a, b, c, etc. along with the year of publications in parenthesis, only in the first quotation. The year should be repeated in each citation if the author has more than one article mentioned.

Follow these examples:

Khoshbin Khoshnazar, A. R.; Jahanshahi, M. & Azami, N. S. Gamma radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis, comparison of single and fractionated dose regimens. *Int. J. Morphol.*, 30(1):145-149, 2012.
Moore K.L. & Dalley A.F. *Anatomía con Orientación Clínica*. 4ª Ed. Panamericana, Buenos Aires, 2002.

- Nomenclature. The terminology should be used according to the last edition of the *Terminología Anatómica*, *Terminología Histológica*, *Terminología Embrionológica*, *Nomina Anatómica Veterinaria* or the *Nomina Anatómica Avium*. The terms in Latin can be translated into the native language (English or Spanish).
 - Cost of publications; Authors are encouraged to submit color illustrations when the color conveys essential scientific information. Color reproduction will be subsidized by the publisher, reducing author costs to US \$300 per page. (Articles in black and white =US \$250).
- All articles submitted for publication must be submitted in English. All articles including the translation of the summary to Spanish will be reviewed at a rate of US \$100- per article. Once approved, articles submitted in Spanish will be translated to English by the *International Journal of Morphology* at a rate of US \$150.