



## The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats

*Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos*

Alessandra P. Alves<sup>1</sup>, Ana R. Dâmaso<sup>2</sup>, Vitalino Dal Pai<sup>3\*</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Estudar características morfológicas, metabolismo e habilidades contráteis do músculo submetido a desnutrição protéica pré e pós-natal.

**Métodos:** Distribuição dos animais em dois grupos: controle, dieta normoprotéica (GC; n = 15; 5/5/5) e desnutrido, dieta hipoprotéica (GD; n = 15; 5/5/5), observados respectivamente no sétimo, 14º e 28º dia do período experimental. Foram avaliados massa corporal total, peso, habilidades contráteis e a morfologia do músculo tibial anterior. Amostras de tecidos com 8 m de espessura de ratos com idades de 7, 14 e 28 dias, corados por hematoxilina e eosina, e outros submetidos aos métodos histoquímicos nicotinamida adenina tetrazólio redutase (NADH-TR) e miofibrilar (m-ATPase) (pH = 4,4).

**Resultados:** Os pesos corporal e muscular apresentaram-se menores nos grupos desnutridos. Aos 7 dias de desnutrição, o músculo apresentou fibras com menor diâmetro, maior polimorfismo e maior teor de tecido conjuntivo endomysial. Nas histoquímicas, tipos de fibras sem delimitação segura. Aos 14 dias de desnutrição, fibras menores, mais polimórficas, muitas com núcleos centrais e moderado teor de tecido conjuntivo endomysial. Quanto à contração, a reação m-ATPase evidenciou fibras lentas e rápidas. A reação NADH-TR revelou os tipos de fibras slow oxidative, fast oxidative glycolytic e fast glycolytic. Aos 28 dias de desnutrição, fibras menores, agrupadas com contornos variáveis. Quanto ao tipo de contração e metabolismo, os três tipos de fibras apresentaram limites de reconhecimento indistinto.

**Conclusão:** Os resultados experimentais sugerem que, além da redução no número de fibras, a desnutrição promove um retardamento na diferenciação das características morfológicas, metabólicas e contráteis dos tipos de fibras musculares esqueléticas em ratos na fase de crescimento.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(3):264-271: Desnutrição, músculo*

esquelético.

### Abstract

**Objective:** To study the contractile properties, metabolism and morphological characteristics of muscles submitted to prenatal and postnatal protein malnutrition.

**Methods:** Animals were distributed into two groups: Control, normoprotein diet (CG; n = 15; 5/5/5), and Malnourished, hypoprotein diet (MG; n = 15; 5/5/5), and examined on the 7th, 14th, and 28th days of the experiment. Total body mass, weight, and the contractile properties and morphology of the anterior tibial muscle were assessed. Several 8 µm-thick tissue samples were taken from 7, 14, and 28 day old rats and stained with HE or subjected to NADH-TR or m-ATPase (pH = 4.4) techniques.

**Results:** Body and muscle weight were lower in the malnourished group. On the 7th day of malnutrition, muscle samples exhibited fibers with smaller diameter, higher polymorphism and higher endomysial conjunctive tissue content. Histochemical methods were unable to precisely determine the types of fiber present. On the 14th day, there were smaller muscle fibers, more polymorphism, many of them with central nuclei and moderate endomysial conjunctive tissue content. With reference to contractile properties, the m-ATPase reaction identified both slow and fast fibers. The NADH-TR reaction revealed the following types of fiber: slow oxidative (SO), fast oxidative glycolytic (FOG) and fast glycolytic (FG). On the 28th day smaller, bunched muscle fibers varying shapes. All three types of fiber exhibited unclear recognition limits with respect to contraction and metabolism.

**Conclusion:** Our experimental results suggest that, in addition to the reduction in numbers of fibers, malnutrition retards the differentiation of the morphological, metabolic, and contractile characteristics of skeletal muscle fibers in growing rats.

*J Pediatr (Rio J). 2008;84(3):264-271: Malnutrition, skeletal muscle.*

1. Mestranda em Fisiologia do Exercício, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, SP.
2. Pós-doutorado em Pediatria. Docente, Departamento de Ciências da Saúde, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP.
3. Doutor, livre-docente. Docente, Departamento de Histologia, Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP.

Fonte fornecedora de equipamentos: Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

**Como citar este artigo:** Alves AP, Dâmaso AR, 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 (Rio J)*. 2008;84(3):264-271.

Artigo submetido em 28.08.07, aceito em 09.01.08.

doi:10.2223/JPED.1769

## Introdução

Em condições de nutrição normal, a captação e utilização de nutrientes estão em equilíbrio e asseguram o crescimento, a maturação e duplicação celular. Tais fenômenos influenciam distintamente as fases de gestação, lactação, jovem e adulta.

As proteínas são nutrientes necessários à homeostasia da célula e, se a deficiência protéica for acentuada, e no período gestacional, conhecida como desnutrição pré-natal, ocorrerá um desequilíbrio, ocasionando alterações nos tecidos e estruturas dos órgãos<sup>1-3</sup>, como redução no peso do concepto, modificações enzimáticas e bioquímicas. Os efeitos da desnutrição intra-uterina dependem da fase do desenvolvimento, sendo estes mais intensos e permanentes quanto mais precoce ocorrer a desnutrição e mais tardio o início da recuperação nutricional<sup>1</sup>.

O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição protéica por ser um reservatório de proteína no organismo. Portanto, quando há déficit protéico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção<sup>2,4,5</sup>, ocasionando alterações nas fases de crescimento e diferenciação das fibras musculares.

A diferenciação dos tipos de fibras procede-se gradualmente, ocorrendo no período pré e pós-natal, variando entre as espécies<sup>6,7</sup>. Durante a embriogênese, há formação simultânea de miotubos primários e secundários, sendo inervados diferencialmente em uma fase do desenvolvimento, e para os miotubos secundários, além da inervação específica, faz-se necessária a atividade muscular<sup>8</sup>.

Ao nascimento, a maturidade da fibra muscular independe do estado nutricional, e a desnutrição energética afeta o músculo esquelético quando imposta na fase de miogênese, alterando a frequência dos tipos de fibras<sup>9</sup>.

Em função da alta prevalência de desnutrição nos países em desenvolvimento, é importante a realização de trabalhos experimentais a fim de avaliar possíveis conseqüências no processo de crescimento em ratos na fase de transição lactente-desmame. Com base nessas informações, a presente pesquisa teve por finalidade avaliar as características morfológicas do tecido muscular estriado esquelético, bem como o metabolismo oxidativo e glicolítico e a habilidade contrátil lenta e rápida das fibras de filhotes de ratas submetidas a desnutrição protéica.

## Métodos

### Experimento

Nesta pesquisa, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), variedade Wistar, sendo 18 fêmeas nulíparas e seis machos, na proporção de 3:1, respectivamente. Assim que detectada a prenhez, os machos foram separados das fêmeas, sendo estas divididas em dois grupos: controle (GC), que receberam dieta normoprotéica (teor de 22% de proteína) e grupo desnutrido (GD), com dieta hipoprotéica (teor

de 8% de proteína), alimentados durante o período de gestação, lactação até o 28º dia do experimento<sup>10</sup>. Os animais foram mantidos em sistema claro/escuro (12/12 h), com temperatura ambiente entre 23 e 25 °C, com ração e água *ad libitum*. Após o nascimento, as proles lactentes com ou sem desnutrição intra-uterina foram ajustadas, permanecendo com as ratas lactantes cinco machos de cada grupo, com idades de 7, 14 e 28 dias. Os animais foram previamente anestesiados com acepromazina a 2%, via intramuscular, e posteriormente submetidos a eutanásia com tionebutal sódico (via intravenosa). O protocolo da eutanásia foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), com o número 025/02. A seguir, foi dissecado o músculo tibial anterior do membro pélvico direito. Em continuidade, da região ventral do músculo foram colhidas amostras de tecido, medindo aproximadamente 1 cm de comprimento x 0,5 cm de diâmetro. Decorridos 5 a 10 minutos de sua permanência em temperatura ambiente, este material foi imerso em n-hexana, a -70 °C, previamente resfriada com o auxílio de nitrogênio líquido.

### Análises histoquímicas

Das amostras de tecido, obtiveram-se várias séries de cortes histológicos com 8 µm de espessura, em um micrótomo criostato, a -22 °C, colhidos em lâminas histológicas por 30 minutos. Após fixação em formol cálcio de Backer, alguns cortes histológicos foram submetidos a coloração hematoxilina e eosina (HE), reação histoquímica nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR) e reação ATPase miofibrilar (m-ATPase), após pré-encubação em meio ácido (pH = 4,4)<sup>11</sup>.

A partir de vários campos microscópicos, foram avaliadas e descritas as características morfológicas do tecido estudado, bem como a reatividade das fibras para o metabolismo oxidativo e glicolítico e para habilidade contrátil lenta e rápida das fibras. As fibras musculares foram classificadas em *slow oxidative* (SO): contração lenta e metabolismo oxidativo; *fast oxidative glycolytic* (FOG): contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico e *fast glycolytic* (FG): contração rápida e metabolismo glicolítico.

### Tratamento estatístico

Os dados relativos ao peso corporal e peso muscular do GC e do GD dos animais estudados foram submetidos a análise estatística utilizando o teste *t* de Student. A porcentagem das fibras oxidativas (SO + FOG) e das fibras glicolíticas (FG) foi submetida a análise de variância não-paramétrica, teste de Kruskal-Wallis e teste de múltipla comparação de Dunn dos ratos com 7, 14 e 28 dias do GC com as fibras do GD. O nível de significância foi definido em  $p < 0,05$ <sup>12</sup>.

## Resultados

### Peso corporal e muscular

Observou-se, no presente estudo, que tanto o peso corporal quanto o peso do músculo tibial anterior dos animais do

**Tabela 1** - Médias dos pesos corporal e muscular e medianas das fibras oxidativas (SO + FOG) e glicolíticas (FG) na prole dos grupos controle e desnutrido, avaliados aos 7, 14 e 28 dias

Peso/fibras	Idade					
	7 dias		14 dias		28 dias	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Peso corporal (g)	12,7±0,63	6,94±0,95*	18,1±1,30	14,6±2,26	50,6±2,30	17,1±1,48*
Peso muscular (mg)	17,4±1,47	4,98±1,75*	26,5±3,24	14,6±2,26*	96,5±4,51	23,9±2,47*
SO + FOG	89,0	90,0	96,0	91,0	91,0	99,0*
FG	31,0	30,0	24,0	29,0	29,0	21,0*

FG = *fast glycolytic*; FOG = *fast oxidative glycolytic*; SO = *slow oxidative*.  
\*  $p < 0,05$ .

GC, observados aos 7, 14 e 28 dias, se apresentaram estatisticamente maiores em relação aos valores encontrados para o GD (Tabela 1).

### **Morfologia, diferenciação e metabolismo: parâmetros histoquímicos**

Conforme revelado pela coloração HE, em cortes transversais ao maior eixo do músculo estudado dos animais do grupo com 7 dias, o tecido muscular revelou-se formado por numerosas fibras com contornos variando de poligonal a arredondado, tendo citoplasma levemente acidófilo, com um ou mais núcleos em posição periférica. No entanto, em muitas fibras notaram-se características indiferenciadas, contorno mais arredondado, núcleos em posição central e citoplasma mais basófilo, além de moderado teor de tecido conjuntivo endomisial. Nesta idade, os fascículos mostraram um padrão de organização pouco definido. Algumas fibras revelaram núcleos em posição central, estando em fase de miotubo, além da ocorrência de células da linhagem miogênica (Figura 1A).

Cortes histológicos, submetidos a reação m-ATPase (pH = 4,4), revelaram intensa reatividade em todas as fibras, caracterizando, assim, tratar-se de fibras possuidoras de habilidade contrátil lenta. Além disso, em algumas fibras de maior diâmetro, a reatividade mostrou-se mais intensa. A reatividade do tecido conjuntivo situado entre as fibras mostrou-se negativa. Embora não sendo possível a delimitação entre os tipos de fibras, a reatividade revelou-se levemente mais intensa em algumas fibras menores. Tais fibras correspondem às do tipo SO, de contração lenta. As demais fibras, com maior diâmetro, correspondem às fibras dos tipos FOG e FG, ambas de contração rápida. Nesta idade, a delimitação entre esses dois tipos de fibras mostra-se indistinta, revelando acentuado teor de miosina de contração lenta (Figura 1C).

Nesse período do crescimento, a reatividade das fibras musculares à enzima NADH-TR, que revela o metabolismo oxidativo/glicolítico, apresentou-se mais intensa nas fibras de menor diâmetro, correspondendo às fibras SO, e mais fracas nas de maior diâmetro, correspondendo aos tipos FOG e FG,

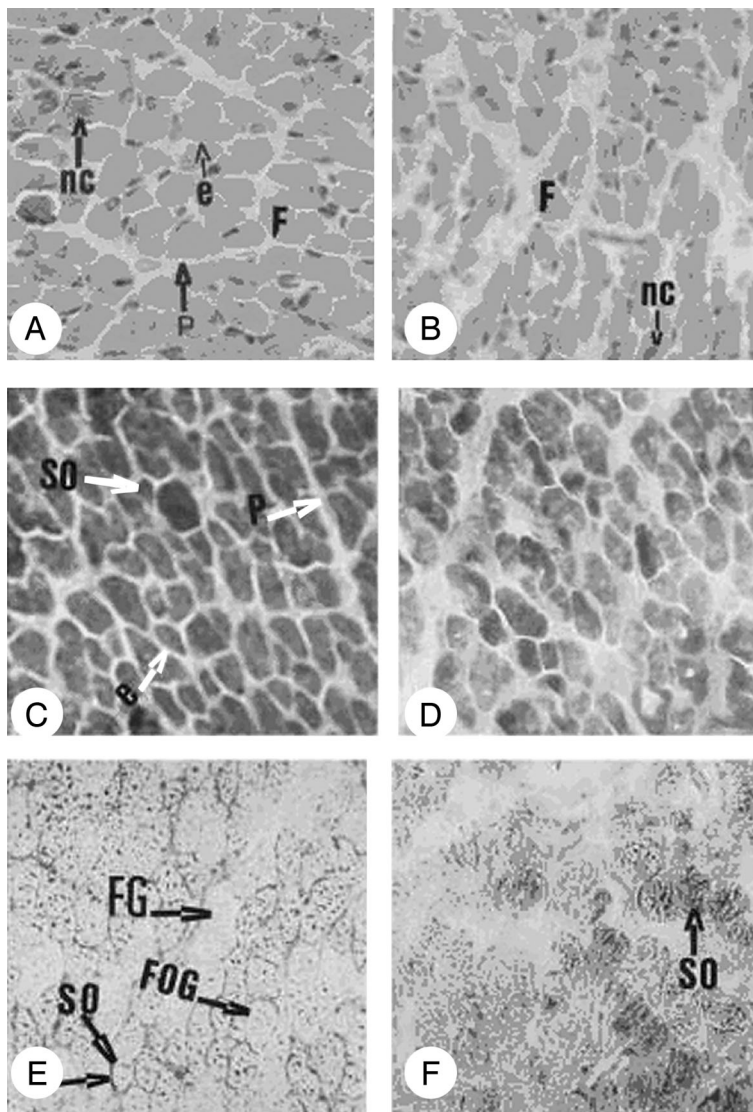
com metabolismo oxidativo/glicolítico e glicolítico, respectivamente. Além disso, nas fibras FOG, a reatividade mostrou intensidade intermediária entre as fibras SO e FG (Figura 1E).

Por outro lado, no tecido muscular dos ratos com 7 dias de desnutrição protéica, as fibras mostraram-se menores, com maior variabilidade nos contornos, com menor acidofilia, além de acentuado teor de tecido conjuntivo frouxo. Além disso, o padrão de organização dos fascículos de fibras musculares mostrou-se não organizado. Observou-se, outrossim, grande número de fibras com núcleo central (Figura 1B).

Cortes subsequentes, quando submetidos a reação m-ATPase (pH = 4,4), revelaram intensidade de reação muito variável entre os tipos de fibras. Em algumas fibras, a reação mostrou-se intensa, variando de moderada a fraca nas demais, havendo grande variabilidade entre os dois extremos. Embora os limites entre as fibras sejam de difícil identificação, as fibras com intensa reatividade correspondem às fibras de contração lenta (SO), e as demais aos tipos FOG e FG, ambas de contração rápida (Figura 1D).

Ainda no grupo de ratos com 7 dias de desnutrição, nos cortes histológicos submetidos à reação que revela o metabolismo oxidativo/glicolítico, a enzima NADH-TR, a reatividade mostrou-se com intensidade variável entre as fibras, sendo discretamente mais intensa do que nas do GC. No entanto, o reconhecimento dos limites entre os tipos de fibras foi pouco nítido neste grupo de animais. Assim, observaram-se fibras menores, com maior reatividade, correspondendo às SO, e fibras com menor reatividade, pertencentes aos subtipos de fibras FOG e FG (Figura 1F).

Aos 14 dias pós-natal, o músculo tibial anterior dos ratos do GC revelou, pela coloração HE, fibras agrupadas em fascículos tendo diferentes diâmetros, contornos poligonais, com um ou mais núcleos em posição periférica. A ocorrência de fibras com núcleo central mostrou-se pouco freqüente. Em relação aos ratos de 7 dias, as fibras revelaram-se maiores e com aspectos mais diferenciados (Figura 2A). Nesta faixa etária, a reação m-ATPase (pH = 4,4) revelou três tipos de fibras:



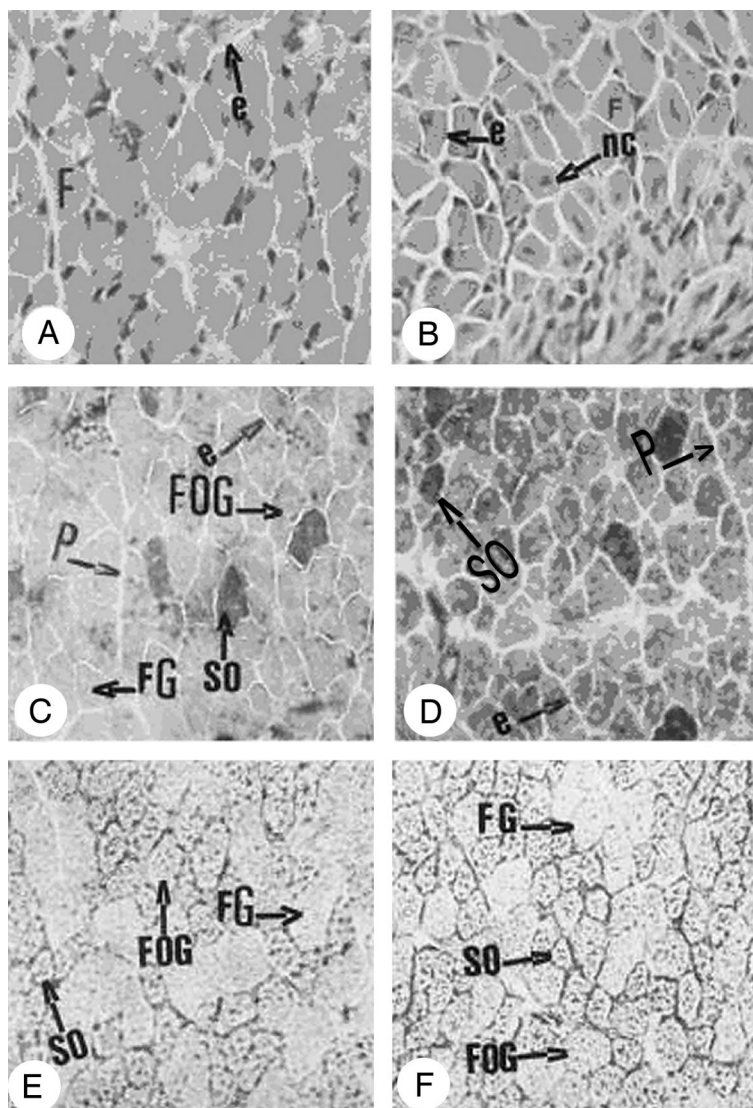
A) Grupo controle: fibras musculares (F), perimísio (P), endomísio (e), núcleo central (nc); HE, 128x. B) Grupo desnutrido: fibras musculares menores, mais polimórficas (F), núcleo central (nc); HE, 128x. C) Grupo controle: fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo (SO), perimísio (P), fibra muscular pequena (B); m-ATPase (pH = 4,4), 128x. D) Grupo desnutrido: fibras mais escuras, intermediárias e claras com diâmetros e contornos; m-ATPase (pH = 4,4), 128x. E) Grupo controle: fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo (SO), de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG) e de contração rápida e metabolismo glicolítico (FG); NADH-TR, 128x. F) Grupo desnutrido: fibras lentas e metabolismo oxidativo (SO), com intensa reatividade, reação moderada e fraca nas demais fibras; NADH-TR, 128x.

**Figura 1** - Cortes transversais do músculo tibial anterior do rato Wistar: HE, m-ATPase (4,4), NADH-TR, 7 dias (controle e desnutrido)

pequenas e com intensa reação (SO), médias, com intensidade de reação moderada (FOG) e grandes, com reatividade fraca (FG). Nesta idade, as FG constituem a maior parte das fibras (Figura 2C). Cortes histológicos, quando submetidos a reação NADH-TR, revelaram intensa reatividade nas fibras menores, correspondendo às fibras SO e FOG, sendo fraca nas de maior diâmetro (FG) (Figura 2E).

De forma significativa, nesta idade o músculo tibial anterior de ratos do GD revelou presença de fibras menores em relação ao GC, com contornos variáveis, muitas com núcleos

centrais, sendo equivalentes a miotubos. Entre as fibras, observou-se moderado teor de tecido conjuntivo (Figura 2B). A reação m-ATPase (pH = 4,4) mostrou reatividade moderada na maioria das fibras. Em algumas fibras (SO), a reação foi mais intensa. Neste período do crescimento, a distinção entre os tipos de fibras FOG e FG mostrou-se pouco perceptível (Figura 2D). Já na reação NADH-TR, observou-se os três tipos básicos de fibras, sendo as SO com reação intensa, as FOG com reatividade moderada e as FG maiores, com reação mais fraca (Figura 2F).



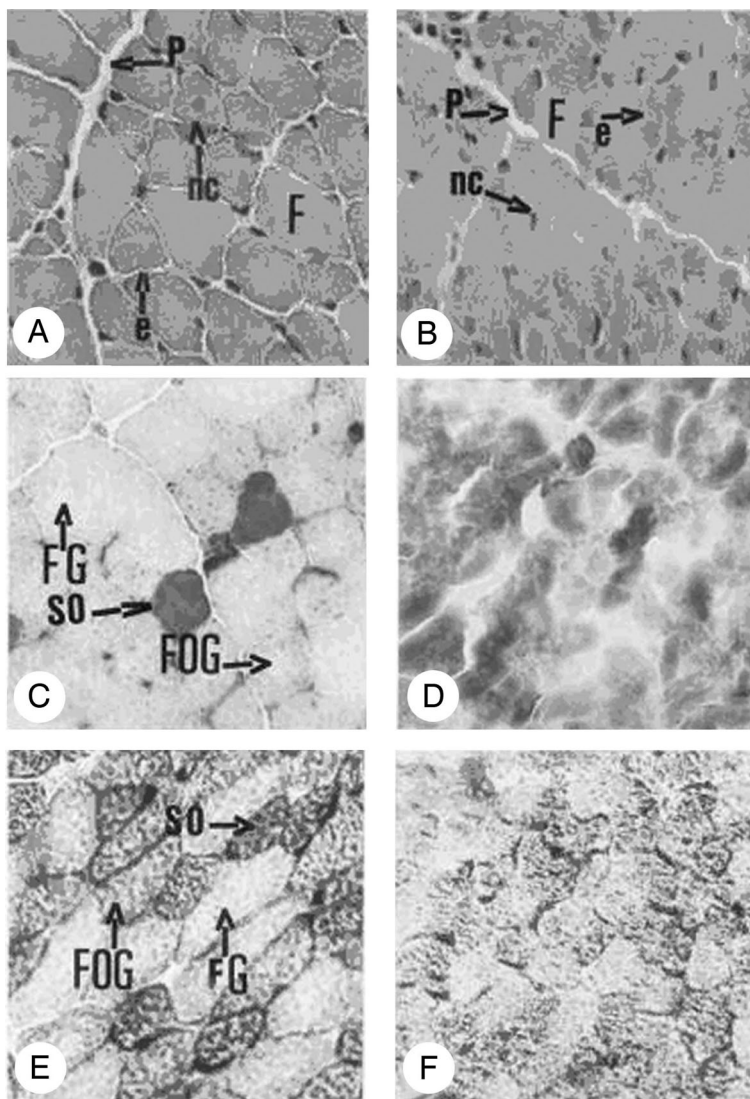
A) Grupo controle: fibras musculares (F), com maior diâmetro e com aspectos mais diferenciados em relação ao grupo de 7 dias, endomísio (e); HE, 128x. B) Grupo desnutrido: fibras musculares (F) menores com maior teor de tecido conjuntivo, fibras com núcleo central (nc), endomísio (e); HE, 128x. C) Grupo controle: tipos de fibras (SO, FOG, FG), endomísio (e), perimísio (P); m-ATPase (pH = 4,4), 128x. D) Grupo desnutrido: fibras com reatividade intensa (SO), reatividade moderada na maioria das fibras, endomísio (e), perimísio (P); m-ATPase (pH = 4,4), 128x. E) Grupo controle: fibras musculares menores (SO, FOG) com maior reatividade e fibras maiores (FG), com reatividade fraca; NADH-TR, 128x. F) Grupo desnutrido: fibras menores, com metabolismo oxidativo (SO + FOG), fibras maiores (FG), com metabolismo glicolítico; NADH-TR, 128x.

**Figura 2** - Cortes transversais do músculo tibial anterior do rato Wistar: HE, m-ATPase (4,4), NADH-TR, 14 dias (controle e desnutrido)

Aos 28 dias, o músculo tibial dos ratos do GC revelou-se formado por fibras com diâmetros significativamente maiores, tendo contornos poligonais e com núcleos periféricos pela coloração HE. Nas fibras menores, o citoplasma revelou-se levemente basófilo, correspondendo ao tipo SO. Algumas fibras ainda revelaram núcleos centrais (Figura 3A). A reatividade à enzima m-ATPase evidenciou os três tipos básicos de fibras: SO, com reatividade muito intensa, sendo moderada nas FOG e fraca nas FG (Figura 3C). Da mesma forma, a reatividade à enzima NADH-TR revelou um padrão de reatividade característico de avançado grau de diferenciação, no

qual as fibras SO, com pequeno diâmetro, mostraram intensa reatividade; para as de diâmetro médio (FOG), a reação mostrou ser de reatividade média e com distribuição homogênea em todo o citoplasma, e as FG, mais hipertróficas, com reatividade fraca (Figura 3E).

No grupo com 28 dias de desnutrição, os padrões morfológicos, metabólico e contrátil das fibras revelaram as seguintes alterações: fibras menores, alongadas e com disposição compacta (Figura 3B); fibras com núcleos centrais; reatividade à m-ATPase forte, média e fraca, com limites poucos nítidos entre os tipos de fibras (Figura 3D); reatividade NADH-TR



A) Grupo controle: fibras musculares (F), com aspecto diferenciado e diâmetros variáveis, perimísio (P), endomísio (e), núcleo central (nc); HE, 128x. B) Grupo desnutrido: fibras (F) com menor diâmetro em relação ao grupo controle, com diâmetros e contornos variáveis, perimísio (P), endomísio (e), núcleo central (nc). C) Grupo controle: tipos de fibras SO, FOG, FG; m-ATPase (pH = 4,4), 128x. D) Grupo desnutrido: fibras musculares com reatividade forte, média e fraca com limites pouco nítidos; m-ATPase (pH = 4,4), 128x. E) Grupo controle: fibras com pequenos diâmetros (SO), com intensa reatividade, fibras de tamanho médio, com reação moderada (FOG), fibras maiores, com fraca reatividade (FG). F) Grupo desnutrido: forte reatividade para metabolismo oxidativo nas fibras pequenas, médias e fraca reatividade nas fibras maiores com metabolismo glicolítico; NADH-TR, 128x.

**Figura 3** - Cortes transversais do músculo tibial anterior do rato Wistar: HE, m-ATPase (4,4), NADH-TR, 28 dias (controle e desnutrido)

forte, média e fraca nas fibras SO, FOG e FG, respectivamente (Figura 3F).

### Discussão

De acordo com a literatura, a restrição alimentar afeta significativamente o crescimento e a diferenciação de tecidos e células. Quanto mais precoce a desnutrição, maior a severidade dos efeitos, ocasionando maior gravidade e extensão dos danos em diferentes órgãos e sistemas corporais<sup>4</sup>. Esses achados reforçam a importância da recuperação nutricional

em fases precoces da vida, visando o crescimento e o desenvolvimento normais<sup>13-15</sup>.

Pesquisas demonstram que a restrição protéica materna no início ou a partir da segunda metade da gestação afeta o peso corporal e o número de fibras musculares da prole, observado em estudos realizados em ratos, cães e macacos com baixo peso ao nascer<sup>2,5,16</sup>.

Em nossas avaliações, o peso corporal do GD mostrou-se significativamente inferior ao do GC. Essa diferença foi aproximadamente três vezes maior na idade de 28 dias, demonstrando acentuação dos efeitos deletérios sobre o crescimento

da prole à medida que aumenta o tempo de desnutrição. Resultados semelhantes foram relatados por diversos autores em seus estudos sobre a desnutrição pré-natal<sup>4</sup>. Observou-se ainda, no presente estudo, que a desnutrição protéica reduziu estatisticamente o peso do tecido muscular. Isso provavelmente ocorreu devido à perda de proteínas teciduais. Vários autores relatam resultados semelhantes<sup>2,5,17</sup>.

Estudos relativos ao tamanho muscular em animais submetidos a desnutrição pós-natal revelaram que tal redução é atribuída principalmente à redução no volume das fibras (hipotrofia) do que ao número total (hipoplasia) de fibras do tecido<sup>17-19</sup>. Já na desnutrição intra-uterina, há evidências de que ocorra o fenômeno de hipoplasia. Assim, na presente pesquisa, o resultado de menor peso muscular dos animais desnutridos parece resultar de ambos os processos, hipoplasia e hipotrofia, uma vez que os mesmos foram submetidos a desnutrição tanto no período intra-uterino quanto no período lactente.

Ao nascimento, mesmo nos ratos normais, o tecido muscular revela elevado número de fibras imaturas. Além do formato das fibras, a maior basofilia citoplasmática e a ocorrência de variável número de fibras com um ou mais núcleos em posição central são características indicativas de imaturidade do tecido<sup>20,21</sup>. Assim, a morfologia, o metabolismo e a habilidade contrátil lenta e rápida das fibras revelaram-se com maior grau de imaturidade nas idades de 7 e 14 dias, porém maior nos ratos submetidos a restrição protéica.

Estudo envolvendo aspectos quantitativos do crescimento e diferenciação das fibras musculares não refere a ocorrência de aumento no espaço intersticial, ainda que com redução do número de fibras<sup>5</sup>. Em nosso estudo, embora o número de fibras não tenha sido analisado, a maior proporção de áreas de tecido conjuntivo frouxo entre as fibras é indicativa de hipoplasia.

Em mamíferos, observou-se que músculos estriados vermelhos tonicamente ativos têm atividade oxidativa muito maior do que os brancos<sup>2</sup>. Segundo a literatura, as fibras vermelhas são de dois tipos: as de contração lenta e metabolismo oxidativo (SO) e as de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG)<sup>22</sup>. Neste estudo, nos períodos estudados, o músculo tibial anterior revelou elevado teor de fibras vermelhas, sendo maior nos GD.

Já as fibras brancas possuem habilidade contrátil rápida e metabolismo glicolítico (FG) e apresentaram, nas idades estudadas, freqüências menores nos ratos dos GD. O maior número de fibras vermelhas observado nos GD parece associar-se ao menor grau de diferenciação das fibras, sendo atribuído à desnutrição.

A maior ou menor coloração vermelha de um músculo ou de suas regiões é dependente dos tipos de freqüência de suas fibras<sup>23</sup>. Para esses autores, a região mais profunda de um

músculo contém maior freqüência de fibras com metabolismo aeróbico (SO e FOG) e, na porção superficial, predomínio das fibras glicolíticas (FG). Estudos prévios nesta área da investigação demonstraram que desnutrição afeta de modo significativo o crescimento e a maturação do sistema nervoso central e periférico<sup>23,24</sup>.

Alguns autores ressaltam que a diferenciação dos tipos de fibra muscular depende do neurônio que a inerva, podendo a carência protéica resultar em hipoplasia<sup>25</sup>.

Nos animais dos GC, e com maior intensidade nos GD, o tecido muscular estudado revelou a presença de fibras com núcleos centrais, sendo equivalente a fibras em fase indiferenciada, os miotubos. No rato, a proliferação de miotubos ocorre a partir de 17º dia de gestação, estendendo-se até a segunda semana após o nascimento<sup>25</sup>. Em nossos resultados, observou-se maior número de miotubos nas semanas após o nascimento, especialmente nos animais desnutridos. Estes miotubos puderam ser detectados ainda nos animais com 4 semanas de idade. Com base na reatividade à m-ATPase, que revela a habilidade contrátil das fibras, lenta e rápida, aos 7 dias foram observadas algumas fibras com maior diâmetro e maior reatividade para miosina de contração lenta do que nas fibras restantes. Estas aparecem dispersas e, do ponto de vista histoquímico, são consideradas equivalentes às fibras basófilas B, com características de mio-tonia descritas por Dubowitz<sup>26</sup>. Em humanos, tais fibras representam 4 a 5% das fibras na 18ª semana de gestação. Sua miosina é do tipo contração lenta<sup>27</sup>, e seu número torna-se muito reduzido em torno da 30ª semana de gestação. Nesta fase do desenvolvimento, as fibras de contração lenta já estão presentes no músculo em maior número, sendo variáveis e fracas, indicando a presença de miosina de contração rápida, caracterizada por sua intensa reatividade à m-ATPase, porém somente quando a reação é realizada sem a pré-incubação em pH ácido<sup>28</sup>.

Nos grupos estudados, o metabolismo oxidativo e glicolítico das fibras revelou-se com padrão de reatividade mais diferenciado do que o da habilidade contrátil, mesmo nos ratos com 7 dias, sendo, no entanto, mais notável nos animais dos GC. Nestes animais, tanto a morfologia das fibras como o tecido conjuntivo endomisial revelou-se normal com maior grau de diferenciação<sup>27,29</sup>.

Os resultados do presente estudo sugerem que a desnutrição intra-uterina e no período lactente promoveu redução no número de fibras, além de retardamento na diferenciação das características morfológicas, metabólicas e contráteis dos tipos de fibras musculares esqueléticas em ratos na fase de crescimento, reforçando a importância da adequação nutricional e evitando que os efeitos deletérios sejam irreversíveis. Entretanto, novos estudos devem ser realizados com o intuito de confirmar essas evidências.

#### **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Vitalino Dal Pai (*in memoriam*), pelo exemplo de grandeza e espírito construtivo, pela amizade e total colaboração e auxílio nas técnicas histoquímicas.

**Referências**

1. Patrício FR, Nóbrega FJ, Tonete SS. **Desnutrição intra-uterina em diferentes períodos de gestação em ratos: estudo do intestino delgado proximal ao nascimento e durante a recuperação nutricional.** Rev Paul Ped. 1984;2:43-52.
2. Nascimento OJ, Madi K, Guedes e Silva JB, Soares Filho PJ, Hahn MD, Couto B, et al. **Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica.** Arq Neuropsiquiatr. 1990;48:395-402.
3. Trindade CE. **Repercussões da nutrição da gestante sobre o recém-nascido.** J Pediatr (Rio J). 1997;73:291-2.
4. Ihemelandu EC. **Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition.** Acta Anat (Basel). 1985; 121:89-93.
5. Oliveira FL, Oliveira AS, Schmidt B, Amâncio OM. **Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações.** J Pediatr (Rio J). 1999; 75:350-6.
6. Dubowitz V. **Enzyme histochemistry of skeletal muscle.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1965;28:516-24.
7. Dubowitz V. **Developing and diseased muscle. A histochemical study.** Spastics International Medical Publications Research Monograph 1968; 2:106.
8. Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. **Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscle.** Development 1987;100: 359-409.
9. Marcondes E. **Conceito e nomenclatura, classificação, etiopatogenia.** In: Marcondes E, coordenador. Desnutrição. São Paulo: Sarvier, 1976. p. 3-28.
10. Sant'Ana DM. **Estudo morfométrico e quantitativo do plexo mientérico do colo ascendente de ratos adultos normoalimentados e submetidos à desnutrição protéica.** [Dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 1996.
11. Peter JB, Bernard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. **Metabolic profiles of the three types of skeletal muscle fibers in guinea pigs and rabbits.** Biochemistry. 1972;11:2627-33.
12. Vieira S. **Bioestatística: tópicos avançados.** Rio de Janeiro: Campus, 2003.
13. Gigante DP, Buchweitz M, Helbig E, Almeida AS, Neumann NA, Victora CG. **Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschool.** J Pediatr (Rio J). 2007;83:363-9.
14. Fortes Filho JB, Barros CK, da Costa M, Procianny RS. **Results of a program for the prevention of blindness caused by retinopathy of prematurity in southern Brazil.** J Pediatr (Rio J). 2007; 83:209-16.
15. Lermann VL, Fortes Filho JB, Procianny RS. **The prevalence of retinopathy of prematurity in very low birth weight newborn infants.** J Pediatr (Rio J). 2006;82:27-32.
16. Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. **Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos.** J. Pediatr (Rio J) 2002;78:39-44.
17. Rowe RWD. **Effect of low nutrition on size of striated muscle fibres in the mouse.** J Exp Zool. 1968;167:353-8.
18. Howells KF, Mathews DR, Jordan TC. **Effects of pre and perinatal malnutrition on muscle fibers from fast and slow rats muscle.** Res Exp Med (Berl). 1978;173:35-40.
19. Stickland NC, Widdowson EM, Goldspink G. **Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs.** Br J Nutr.1975;34:421-8.
20. Dall Pai V, Thomaz E, Curi PR. **Postnatal growth of skeletal muscle of the rat.** Gegenbaurs Morphol Jahrb. 1984;130:827-34.
21. Sarnat HB. **Developmental disorders of muscle.** In: Mastaglia FL, Walton SJ, editors. Skeletal muscle pathology. New York: Churchill Livingstone; 1982. p. 140-60.
22. Henriksson-Larsen K, Fridén J, Wretling ML. **Distribution of fiber sizes in human skeletal muscle. An enzyme histochemical study in m tibialis anterior.** Acta Physiol Scand.1985;123:171-7.
23. Winick M, Rosso P. **Brain DNA synthesis in protein-calorie malnutrition.** In: Olson RE, editor. Protein-calorie malnutrition. New York: Academic Press; 1975. p. 94-101.
24. Chaves N, Linhares ED, Varela RM. **Desnutrição calórico-protéica.** In: De Angelis RC, editor. Fisiologia da nutrição. v. 2. São Paulo: Edart; 1977.
25. Mastaglia FL, Walton SJ. **Skeletal muscle pathology.** New York: Churchill Livingstone; 1982.
26. Dubowitz V, Brook MH, Neville HE. **Muscle biopsy: a modern approach.** London: W. B. Saunders; 1985.
27. Shafiq SA, Asiedu SA, Milhorat AT. **Effect of neonatal neurectomy on differentiation of fiber types in rat skeletal muscle.** Exp Neurol.1972;35:529-40.
28. Askanas V, Shafiq SA, Milhorat AT. **Histochemistry of cultured aneural chick muscle. Morphological maturation without differentiation of fiber types.** Exp Neurol. 1972;37:218-30.
29. Brameld JM. **The influence of undernutrition on skeletal muscle development.** Br J Nutr. 2004;91:327-8.

## Correspondência:

Alessandra Pires Alves  
 Rua Moacir Colognesi, 2397  
 Jardim Petrópolis  
 CEP 87506-190 – Umuarama, PR  
 Tel.: (44) 3622.1254, (44) 3624.5351  
 E-mail: gui-pires@unipar.br