



## ARTIGO ORIGINAL

## ***Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações***

*Intrauterine energetic malnutrition in rats: muscle skeletal changes in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generations*

Fernanda L.C. Oliveira<sup>1</sup>, Acary S.B. Oliveira<sup>2</sup>, Beny Schmidt<sup>3</sup>, Olga M.S. Amancio<sup>4</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Estudar o músculo esquelético (ME) de recém-nascidos desnutridos intra-uterinos através de biopsia muscular com estudo histoquímico.

**Material e Métodos:** Utilizaram-se ratas Wistar EPM-1, 90 dias, peso  $200 \pm 20$ g, desnutridas durante toda gestação. No 21<sup>o</sup> dia de gestação foi colhida biopsia do músculo *biceps braquii* dos recém-nascidos (RN), obtidos por cesária (1ª geração). Um grupo de RN desnutridos foi recuperado nutricionalmente após o nascimento, pela permanência de seis filhotes/rata nutriz e pela alimentação *ad libitum* até o 90<sup>o</sup> dia de vida, quando as fêmeas foram colocadas para cruzamento, originando os recém-nascidos da 2ª geração.

**Resultados:** O ganho de peso durante a gestação e o peso do RN foram significativamente diferentes quando comparado cada grupo desnutrido ao seu respectivo grupo controle. As biopsias musculares dos RN desnutridos intra-uterinos apresentaram comprometimento como perda do predomínio de fibra tipo II, diminuição do diâmetro das fibras musculares, baixa atividade oxidativa, proliferação de tecido intersticial e edema. Na segunda geração, os recém-nascidos apresentaram peso corporal adequado, mas mantinham o comprometimento do tecido muscular como diminuição do predomínio de fibras tipo II, diminuição do diâmetro das fibras musculares, baixa atividade oxidativa, presença de aumento de espaço intersticial, aumento de necrose mas sem edema.

**Conclusão:** A desnutrição energética na fase intra-uterina afeta diretamente o ME, podendo causar alterações irreversíveis que se repetem na geração seguinte, indicando a gravidade de a desnutrição ocorrer na fase crítica de desenvolvimento do tecido muscular.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(5): 350-356: músculo, transtornos nutricionais, metabolismo, biopsia, ratos.*

### Abstract

**Objective:** To study by histochemical analysis the skeletal muscle in malnourished newborn rats submitted to intrauterine malnutrition.

**Methods:** 90 days old female, Wistar EPM-1 rats, with  $200 \pm 20$ g body weight, malnourished during the gestation period were studied. At the 21<sup>th</sup> day of gestation, muscular biopsy was performed in the *biceps brachii* of the newborns, obtained by cesarean (1<sup>st</sup> generation). One group of newborn intrauterine malnourished rats had nutritional recovery after birth by staying six/lactating rat and by free feeding up to the 90<sup>th</sup> day of life, when the females became pregnant and their offspring formed the 2<sup>nd</sup> generation.

**Results:** Weight gain during gestation and body weight of the newborn were significantly different when each malnourished group was compared to its respective control. The muscular biopsies of the malnourished newborns presented tissue involvement, characterized by loss of predominance of type II fibres, low oxidative activity, lessening of muscular fiber diameter, proliferation of interstitial tissue, and edema. In the 2<sup>nd</sup> generation, the newborns presented adequate body weight, but maintained muscular tissue involvement, with lessening of predominance of type II fibers, reduction of muscular fiber diameter, low oxidative activity, increase of interstitial space, necrosis, but without edema.

**Conclusion:** The energetic malnutrition affects the skeletal muscle at birth, when it occurs during miogenesis, in both 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation, maintaining permanent or temporary lesions in the muscular tissue.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(5): 350-356: muscle, nutrition disorders, metabolism, biopsy, rats.*

1. Doutora em Medicina - UNIFESP/EPM.

2. Médico Departamento de Neurologia - UNIFESP/EPM.

3. Médico Departamento de Anatomia Patológica - UNIFESP/EPM.

4. Profª. Adjunto Doutor - UNIFESP/EPM.

Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina.

### Introdução

O primeiro trabalho citado na literatura sobre a repercussão da desnutrição no músculo humano estudou o tamanho da fibra muscular<sup>1</sup>. As alterações histológicas musculares foram estudadas por meio de biopsias de

deltóide e trapézio em crianças com kwashiorkor, em Banter<sup>2</sup>. Foram observadas alterações musculares nos sartórios de seis lactentes jamaicanos que faleceram por desnutrição, notando-se diminuição significativa do diâmetro das fibras musculares no corte transversal; redução da área ocupada pelos feixes musculares; e acentuado descréscimo no tamanho individual das fibras musculares, quando comparadas com as de crianças eutróficas<sup>3</sup>.

A formação do miotubo primário e secundário foi estudada no "músculo lumbrical" em ratos<sup>4</sup>. O desenvolvimento muscular ocorre em duas fases, sendo que os miotubos primários originam-se espontaneamente, e a formação dos miotubos secundários requer tanto a presença como a atividade da inervação motora<sup>5</sup>.

O número de miotubos primários, o número de motoneurônios marcados para morrer<sup>6</sup> e a média de terminações nervosas para cada motoneurônio<sup>7</sup> dependeriam de fatores genéticos. O tamanho do músculo adulto seria resultado da população de mioblastos neuro-dependentes que determinaria a razão de miotubos secundários e primários. Desse modo, a fibra muscular de cada espécie parece estar relacionada com o número de miotubos primários e com a razão de miotubos secundários e primários na fibra muscular.

Foi relatado que o músculo predominantemente vermelho teria mais de 75% de fibras lentas (aeróbicas), que possuem alta capacidade oxidativa e baixa capacidade glicolítica e que o músculo predominantemente branco teria mais de 50% de fibras rápidas (anaeróbicas), com baixa capacidade oxidativa e alta capacidade glicolítica<sup>8</sup>. Três diferentes tipos de fibras foram descritas: as fibras vermelhas lentas (tipo I), que têm baixa capacidade glicolítica, alta capacidade respiratória e baixa atividade miosina-ATPase; as fibras vermelhas rápidas (tipo II A ou tipo intermediário), que possuem alta capacidade glicolítica, alta capacidade respiratória e moderada a alta atividade miosina-ATPase; e as fibras brancas rápidas (tipo II B), caracterizadas pela alta capacidade glicolítica, baixa capacidade respiratória e alta atividade miosina-ATPase<sup>9</sup>.

Estudo histoquímico do músculo deltóide em pacientes adultos com desnutrição secundária a uma doença crônica mostrou a presença de fibras atróficas angulares tipo II e de sacos nucleares, com graus de intensidade variáveis. Em alguns pacientes, além da atrofia da fibra tipo II, havia alteração do padrão mosaico normal, com formação de agrupamento de determinado tipo de fibra I ou II (*type grouping*), indicando comprometimento neurogênico associado<sup>10</sup>.

No Brasil, trabalhos experimentais em ratos submetidos à desnutrição intra-uterina estudaram o peso do músculo esquelético associado à concentração de cobre<sup>11</sup> e à histologia muscular por microscopia eletrônica, após a fase de lactação<sup>11</sup>.

Avanços têm sido feitos na elucidação dos mecanismos envolvidos na miogênese do tecido muscular e na repercussão da desnutrição pós-natal nesse tecido, mas dúvidas

ainda persistem, especialmente se as alterações podem perpetuar em gerações subseqüentes.

Assim, este trabalho teve o objetivo de verificar o efeito da desnutrição na fase intra-uterina sobre a miogênese em duas gerações de ratos.

## Material e Métodos

Todos os animais foram mantidos em biotério com controle de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), de temperatura (22,2°C), de renovação de ar e em caixas de polipropileno com cama de maravalha esterilizada.

Foram utilizadas, primeiramente, ratas Wistar nulíparas que, para inclusão no estudo, apresentavam pelo corporal de 200 ± 20g aos 90 dias de vida. Essas ratas foram randomizadas e formaram grupos que deram origem aos animais da 1ª e 2ª gerações, da seguinte forma:

### *Animais da 1ª geração*

*Grupo Controle - RN 1C:* animais recém-nascidos obtidos por cesárea, cujas mães (GC) receberam ração comercial para ratos (Labina-Purina®) *ad libitum* durante todo período gestacional;

*Grupo Desnutrido - RN 1D:* animais recém-nascidos desnutridos, cujas mães (GD) receberam o mesmo tratamento do grupo controle, com exceção da quantidade de ração oferecida, que foi reduzida a 50% da ingestão do grupo controle<sup>13</sup>;

*Grupo Desnutrido Recuperado - DR:* animais recém-nascidos desnutridos, obtidos por parto normal, que, a partir do nascimento, foram recuperados nutricionalmente ofertando-se ração comercial *ad libitum* às ratas lactantes e garantindo alimentação adequada aos lactentes pela redução da prole a seis animais, sendo três machos e três fêmeas, por rata nutriz.

A partir do 21º (desmame) até o 60º dia de vida, esses animais receberam ração comercial *ad libitum*. O peso corporal desse período foi comparado com peso corporal padrão de ratos Wistar-EPM-1.

### *Animais da 2ª geração*

Aos 90 dias de vida, as fêmeas do grupo DR foram colocadas para cruzamento com machos adultos eutróficos (90 dias, peso corporal de 300 ± 20g), formando o grupo GDR, que, durante o período gestacional, recebeu ração comercial *ad libitum*. Os seus recém-nascidos, obtidos por cesárea no 21º dia de gestação, formaram os animais da 2ª geração: Grupo RN2.

A água foi oferecida *ad libitum* a todos os animais.

O músculo esquelético utilizado para análise histoquímica foi o *biceps braquii* das patas dianteiras dos recém-nascidos de 1ª e 2ª gerações. Os fragmentos musculares foram processados imediatamente após sua retirada<sup>14</sup>. As colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina (HE); sudan vermelho; tricômio de Gomori modificado; e ácido periódico de Schiff (PAS). Foram processadas reações

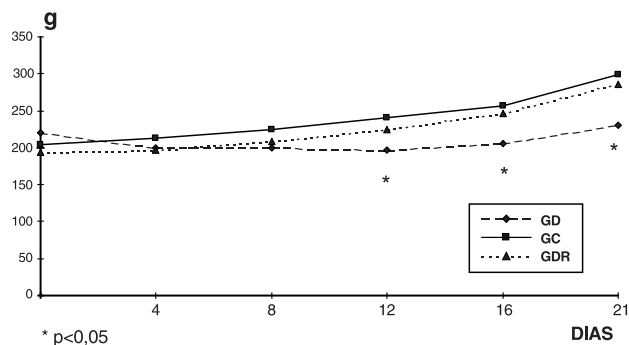
histoquímicas para adenosina-trifosfatase pré-incubada em diferentes pH (9,4; 4,63; 4,35); nicotinamida desidrogenase tetrazolium-reductase (NADH) e succino-desidrogenase (SDH). A análise e a avaliação do material foram feitas em microscópio óptico marca Nikon, modelo Labofot, com aumentos variáveis de 40 a 1150 micra, acoplado à máquina fotográfica marca Nikon, modelo F3.

Para a análise estatística, utilizaram-se testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a natureza das variáveis estudadas. Análise de Variância a um critério para comparar os grupos estudados; quando a estatística "F" mostrou-se significativa, foi complementada pelo teste de contraste de Scheffé<sup>15</sup>; o teste "t" de Student, para amostras independentes<sup>16</sup> para comparar o peso dos recém-nascidos e os dos ratos recuperados; Qui-quadrado ( $\chi^2$ )<sup>17</sup> para verificar a existência de associação entre as variáveis qualitativas, biopsias musculares, com distribuição de frequências entre os grupos; quando o número amostral foi menor que 20 ou se uma das frequências apresentou valor menor que 5, utilizou-se o teste Exato de Fischer<sup>18</sup>. Em todos os testes fixou-se em 0,05% ou 5% ( $\alpha \leq 0,05\%$ ) o nível para rejeição da hipótese de nulidade e assinalou-se com asterisco os valores significantes.

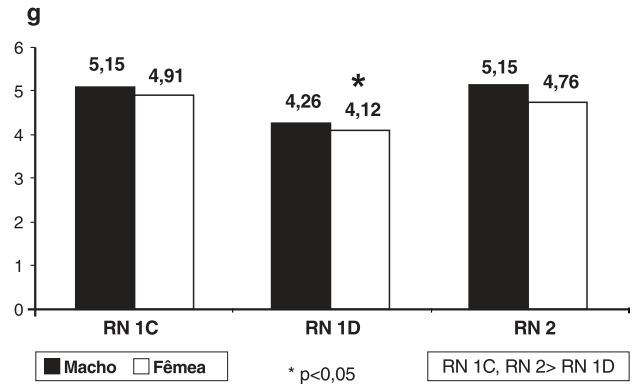
## Resultados

Aos 90 dias de vida, os animais dos grupos GC (197,5 ± 10,5g), GD (197,5 ± 7,3g) e GDR (185,3 ± 16,9g) não apresentaram diferença significativa no peso corporal, indicando a homogeneidade da amostra (Análise de Variância.:  $F_{cal}=2,42$ ,  $F_{crit}=2,45$ ).

A evolução do peso corporal das ratas gestantes (Figura 1) mostra valores estatisticamente menores nos animais do grupo GD, a partir do 12º dia do período gestacional. Também o peso dos ratos recém-nascidos (Figura 2) do grupo RN1D foi significativamente menor do que o dos grupos RN1C e RN2, tanto para machos quanto para fêmeas. Esses resultados evidenciam que a metodologia empregada para obtenção de desnutrição intra-

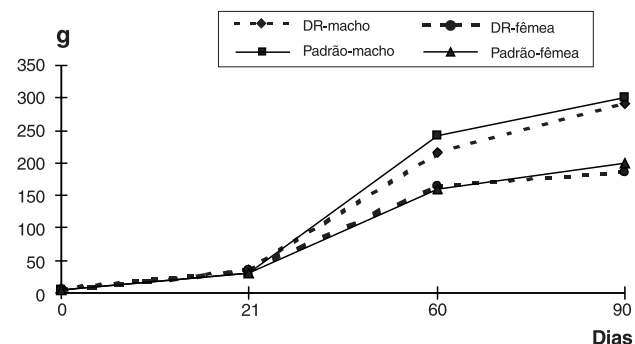


**Figura 1** - Evolução do peso corporal (g) das ratas gestantes



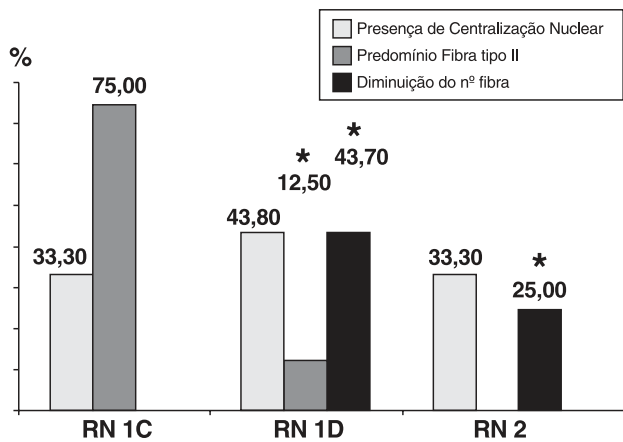
**Figura 2** - Peso corporal (g) dos ratos recém-nascidos

uterina foi eficiente. A evolução ponderal dos animais do grupo DR, comparada com a curva padrão adotada pelo Laboratório de Pesquisa para animais da mesma idade e sexo, não mostrou diferença significativa em nenhum dos momentos estudados, indicando que houve recuperação nutricional desses animais, demonstrando também a eficiência do modelo de recuperação utilizado (Figura 3).



**Figura 3** - Evolução ponderal (g) dos ratos desnutridos recuperados

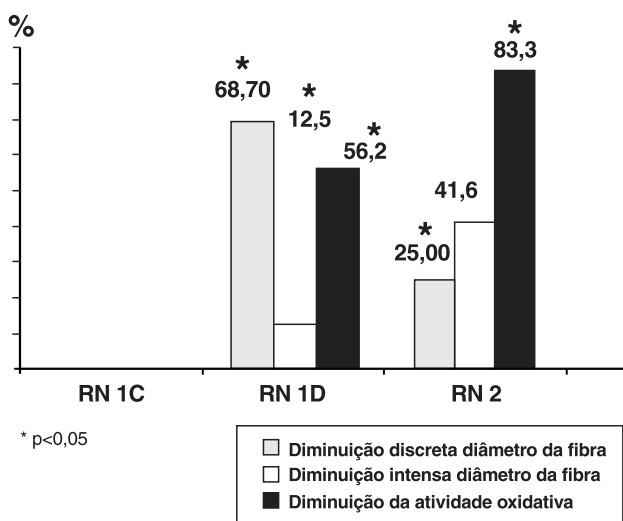
Na Figura 4, observa-se que a presença da centralização nuclear não mostrou diferença significativa entre os três grupos (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=0,44$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ), sendo que no desnutrido (RN 1D) houve tendência a um percentual maior (43,8%). O predomínio de fibra tipo II apareceu em 75,0% no grupo RN 1C, 12,5% no RN 1D, enquanto que nos animais da 2ª geração (RN2) ocorreu ausência de predomínio (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=19,94^*$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ). Quanto ao número de fibras, nota-se diminuição em 43,7% no grupo RN 1D e de 25% no RN2, havendo diferença significativa entre os dois grupos e RN 1C (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=7,00^*$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ).



\* p<0,05

**Figura 4** - Análise histoquímica dos músculos *biceps braquii* dos ratos recém-nascidos

Os resultados do diâmetro das fibras e da atividade oxidativa encontram-se na Figura 5. Nos grupos RN 1D e RN 2 observa-se diminuição do diâmetro das fibras em 81,2% e 66,7%, respectivamente (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=19,53^*$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ). No grupo RN 1D, nota-se a presença de intensa diminuição do diâmetro das fibras em 12,5% dos casos estudados e discreta diminuição em 68,7%. Na segunda geração (RN 2), 41,6% apresentaram intensa diminuição e 25% diminuição discreta (Teste Exato de Fisher:  $p=0,0408^*$ ). A atividade oxidativa mostra-se diminuída em 56,2% no grupo RN 1D e 83,3% no RN2 (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=17,53^*$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ) (RN 1C < RN 1D, RN 2).



\* p<0,05

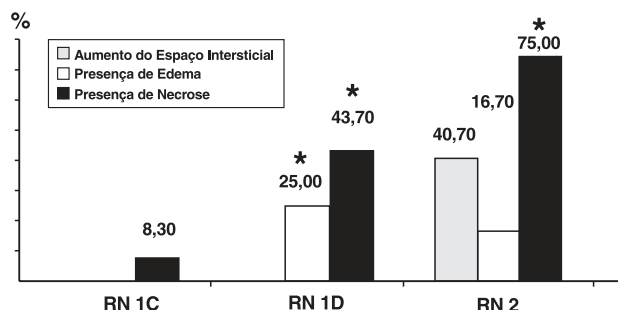
**Figura 5** - Análise histoquímica dos músculos *biceps braquii* dos ratos recém-nascidos

Observa-se que o aumento do espaço intersticial só ocorreu no músculo dos animais da segunda geração em 40,7% (RN2); que o edema se faz presente nos grupos RN 1D (25%) e RN 2 (16,7%) (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=4,80$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ); e que os três grupos, RN 1C, RN 1D, RN 2, apresentaram necrose em 8,3%, 43,7% e 75% respectivamente (Figura 6) (Teste Qui-quadrado:  $\chi^2_{cal}=10,93^*$ ,  $\chi^2_{crit}=5,99$ ).

**Discussão**

Ao nascimento, a literatura descreve claramente a imaturidade da fibra muscular em ratos, e sua maturidade em grandes mamíferos como o ser humano<sup>19</sup>. Como este trabalho foi realizado no músculo esquelético de ratos recém-nascidos, a presença de centralização nuclear das fibras musculares em todos os grupos confirma a imaturidade desse tecido nesse período da vida.

A desnutrição poderia explicar a diminuição do predomínio da fibra tipo II no grupo RN 1D e o desaparecimento do predomínio no grupo RN2, pois vários trabalhos na literatura dissertam a respeito da privação alimentar ter maior agravo sobre a fibra tipo II do que sobre a tipo I<sup>20</sup>.



\* p<0,05

**Figura 6** - Análise histoquímica dos músculos *biceps braquii* dos ratos recém-nascidos

A atrofia seletiva da fibra tipo II é explicada na miogênese do músculo, pois as fibras tipo I (lentas) seriam compostas de grande proporção de fibras musculares provenientes dos miotubos primários, que são resistentes às influências ambientais; enquanto que as fibras tipo II (rápidas) teriam grande proporção de fibras musculares provenientes dos miotubos secundários, suscetíveis aos agravos nutricionais e fatores neurotróficos<sup>21</sup>. Achados histopatológicos semelhantes foram encontrados em humanos<sup>22</sup> e em ratos<sup>23</sup>.

A diminuição do número da fibra encontrada no grupo RN 1D talvez fosse uma tentativa do organismo de produzir menor número de fibras e preservar as fibras

formadas, pois nesse grupo notou-se grau discreto de diminuição do diâmetro das fibras musculares.

O número total de fibras é o mesmo durante toda a vida do animal, não havendo diferença entre os sexos<sup>24</sup>. O crescimento das fibras musculares ocorreria por hipertrofia das fibras existentes, por provável acréscimo do número de miofibrilas, que têm como essencial integrante a proteína<sup>25</sup>. A diminuição do número e do diâmetro das fibras em animais jovens desnutridos ocorreria por perda de miofibrila e conseqüente perda de fibras<sup>26</sup>. O miotubo necessita de proteína para síntese de actina e miosina que acontece após a fusão dos mioblastos. O processo da maturação total das fibras musculares envolveria coordenadamente miofibrilas e sistema sarcotubular, com proliferação de mitocôndrias, deposição de glicogênio e inervação<sup>26</sup>.

O número de fibras de cada músculo depende de fator genético e ambiental<sup>27</sup>. O número de fibras, em animais mamíferos jovens, estaria reduzido quando a mãe fosse submetida a desnutrição durante a gestação e a lactação<sup>28</sup> permanecendo constante após a fase de amamentação<sup>29</sup>.

Trabalho desnutrindo cobaias durante toda gestação, utilizando dieta restritiva em 40% da quantidade ingerida pelo grupo controle verificou importante redução do número de fibras musculares do bíceps e extensor *digitorum longus*, embora não houvesse redução significativa no *soleus*. Isso demonstra que a localização topográfica do músculo não seria importante para o comprometimento resultante do agravo nutricional, mas sim o tipo de fibra muscular predominante nesse músculo<sup>30</sup>.

Os resultados deste trabalho mostram que o bíceps do rato recém-nascido, do grupo controle, tem predomínio de fibras tipo II, rápidas que seriam mais suscetíveis à desnutrição energética durante o período gestacional, acarretando diminuição do número de fibras musculares.

Na segunda geração, houve diminuição do número de fibras musculares, indicando que a desnutrição energética poderia alterar o número de fibras musculares na fase crítica de desenvolvimento desse tecido.

O desenvolvimento do músculo seria bifásico<sup>31,31</sup>. O número de miotubos secundários receberia influência de fatores ambientais como paralisias e desnervação<sup>31,32</sup>. O miotubo primário parece não sofrer influência ou ser refratário às manipulações experimentais<sup>31,33</sup>.

Estudo experimental com ratos que avaliou a capacidade do músculo em desenvolver-se após desnutrição em período crítico de formação de miotubos sugere que a desnutrição intra-uterina afeta apenas a formação de miotubos secundários<sup>34</sup>, resultado concordante com a literatura<sup>22,35</sup>. A especificidade e a cronologia de desenvolvimento de cada músculo poderia explicar o agravo da desnutrição afetar diferentemente cada músculo, acarretando capacidade ou não de recuperação total desse músculo.

Não se tem dúvida da alteração muscular acarretada pela desnutrição, sendo que, quanto mais precoce a agressão, maior a gravidade e extensão desse dano<sup>26</sup>. Poucos trabalhos na literatura, como o presente, preocuparam-se com o efeito da desnutrição na fase intra-uterina e suas repercussões na miogênese. Verificou-se importante redução do diâmetro das fibras musculares tipos I e II de ratos desnutridos durante a gestação e pós-natal, porém com maior comprometimento do diâmetro das do tipo II.

A taxa de proliferação e de fusão estariam reduzidas nos animais desnutridos, mesmo que o número de mioblastos fundidos permanecesse constante para cada miotubo<sup>32,36</sup>. O número de miotubos secundários formados em cada músculo seria adequadamente regulado<sup>4</sup>, e a presença da terminação nervosa teria um papel fundamental no início da fusão de células para originar os miotubos secundários<sup>33</sup>. Haveria necessidade da existência do miotubo nascente secundário para aglutinar os mioblastos e se desenvolver. A desnutrição parece atingir, direta ou indiretamente, diminuindo o número de sub-população de células miogênicas, que seria a responsável pelo início do processo de maturação da fibra muscular, podendo limitar permanentemente o número de miotubos secundários<sup>34</sup>.

O comprometimento da unidade motora em crianças indianas desnutridas foi exaustivamente descrito por diversos autores<sup>37,38</sup>. Esses autores consideram que as alterações musculares da desnutrição seriam decorrentes de lesões do nervo periférico e/ou do corno anterior da medula<sup>39</sup>. A deficiência no crescimento e no calibre das fibras nervosas do ciático e suas raízes, atingindo com maior exuberância as fibras mais grossas, foi verificada em estudos de desnutrição intra-uterina em ratos<sup>40</sup>. Na recuperação nutricional desses animais, o calibre das fibras foi normalizado, mas o crescimento das fibras nervosas permaneceu comprometido.

Uma explicação seria o aparecimento de um fenótipo mutante por possíveis alterações próximas a um gene importante para o desenvolvimento ou para a função muscular<sup>41</sup>. Sabe-se que as substâncias químicas e as radiações ionizantes seriam agentes mutagênicos capazes de afetar esse tecido<sup>41</sup>. Nas células dos mamíferos, observam-se numerosos exemplos de controle da expressão genética da tradução, acarretando mudanças da taxa de síntese protéica durante a mitose, por privação nutricional, por choque hiperdinâmico e por infecção viral<sup>42</sup>. Essa teoria poderia explicar o fato de a segunda geração ter apresentado diminuição do diâmetro da fibra muscular, apesar da recuperação nutricional na primeira geração, pois o peso corpóreo tornou-se adequado, mas provavelmente sua miogênese e/ou seu controle genético foram alterados, não sendo possível gerar uma prole com tecido muscular íntegro na segunda geração.

A diminuição da atividade oxidativa no grupo RN 1D mostra que a desnutrição estaria limitando a refosforilação do ADP para ATP, indicando inibição da função mitocondrial e restrição da glicogenólise<sup>43</sup>. Animais jovens sub-

metidos à desnutrição e à posterior recuperação nutricional mantêm o agravo prévio de ultra-estrutura de mitocôndrias<sup>44</sup> e mantêm a limitação da refosforilação do ADP<sup>45</sup>. Esses fatos indicam persistência da disfunção mitocondrial, apesar da recuperação nutricional.

Estudo em coelhos utilizando cloranfenicol, inibidor da tradução de ribossomos mitocondriais, demonstrou que a mitocôndria não teria participação no mecanismo regulador da tradução dos genes nucleares e mitocondriais para alterar a atividade contrátil do músculo esquelético<sup>46</sup>. Desse modo, a persistência da diminuição da atividade oxidativa na segunda geração implicaria na desnutrição estar ou não acarretando danos enzimáticos, danos irreversíveis ou retardo na atividade do músculo após recuperação nutricional prolongada. O estudo da segunda geração termina ao nascimento, ficando impossível optar por uma dessas hipóteses.

O aumento de tecido conectivo durante a desnutrição parece ser um dado constante na literatura<sup>27,47</sup>. A desnutrição precoce acarretaria retardo no crescimento das células em relação ao desenvolvimento do tecido conjuntivo, enquanto que na fase adulta acarretaria perda de tecido celular significativamente maior que a encontrada no tecido conjuntivo<sup>47</sup>.

O rato submetido à desnutrição energética intra-uterina (RN 1D) não apresentou aumento de espaço intersticial, contrariando a literatura. A desnutrição energético-protéica parece não ser capaz de comprometer a proporção de proteínas intra e extracelular durante a miogênese, ocorrendo a preservação do diâmetro da fibra e do espaço intersticial às custas da diminuição do número das fibras.

A segunda geração (RN 2) apresentou aumento do espaço intersticial. Uma explicação para esse resultado seria a possibilidade da privação nutricional causar danos na mensagem genética da miogênese nas gerações futuras.

Sabe-se que a biopsia por congelamento não seria método ideal para avaliar edema, mas os dados obtidos neste trabalho, apresentam-se compatíveis com os da literatura<sup>47,48</sup>, que observaram aumento da água extracelular do tecido muscular na desnutrição, provavelmente, por alteração na bomba de sódio/potássio, cuja integridade sofreria várias influências como a modulação hipotalâmica<sup>49</sup> e o transporte do íon cálcio<sup>50</sup>.

A necrose poderia ser encontrada freqüentemente na miopatia por deficiência de vitamina E. Neste trabalho, essa causa foi afastada pois a quantidade oferecida dessa vitamina na ração utilizada foi adequada, 30UI/kg ração<sup>51</sup>.

A desnutrição na fase crítica de desenvolvimento muscular poderia alterar a síntese de proteína, acarretando fragilidade maior do tecido a agravos externos. A presença freqüente de necrose na 2ª geração indicaria que as fibras musculares manteriam persistentemente uma provável maior suscetibilidade aos agravos externos.

Os resultados obtidos no músculo *biceps braquii* do rato permitem as seguintes conclusões:

- 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 e altera o predomínio do tipo de fibra muscular nas duas gerações;

- na 1ª geração, a desnutrição energética acarreta hipoplasia muscular;

- na 2ª geração, apesar da recuperação nutricional, mantêm-se lesões definitivas ou transitórias do tecido muscular, possivelmente provenientes da 1ª geração.

### Referências bibliográficas

- Halban J, 1983: apud Walls T. Structure and Function of Muscle. New York: Ed. Bourne Academic Press; 1960.
- Vincent M, Radermecker MA. Histologic investigation of muscle tissue in kwashiorkor. Am J Trop Med Hyg 1959; 8:511-17.
- Montgomery RD. Muscle morphology in infantile protein malnutrition. J Clin Path 1962; 15:511-21.
- Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. Development 1987; 100:383-94.
- Harris AJ. Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscles: I. Neural regulation of muscle fibre numbers. Phil Trans Roy Soc Lond B 1981; 293:257-77.
- Cairns S, McCaig CD, Harris AJ. Determination for motoneuron death during embryonic development of rat spinal cord. Proc Otago Med Sch 1986; 64:3-4.
- Harris AJ, McCaig CD. Motoneuron death and the motor unit size during embryonic development of rat. J Neurosci 1984; 4:14-24.
- Beatty CH, Basinger GM, Dully CC, Bocek RM. Comparison of red and white voluntary skeletal muscles of several species of primates. J Histochem Cytochem 1966; 14:590-600.
- Armstrong RP, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. Am J Anat 1984; 171:259-72.
- Lancellotti CL, Ponzoni ME, Schimdt B, Rasslan A. Estudo histoquímico da musculatura esquelética em doentes desnutridos. Rev Paul Med 1988; 106:109-96.
- Amancio OMS, Nóbrega FJ, Ancona Lopez F, Gerardi V, Ceragioli, FL. Comportamento do cobre na desnutrição da gestante e no produto da concepção: estudo experimental em ratos. Rev Paul Pediatr 1983; 4:52-63.
- Nascimento OM, Madi K, Silva JBG, Soares Filho PJ, Hahn MD, Couto B et al. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo) 1990; 48:395-402.
- Hsueh AM, Blackwell RQ, Chow BF. Effect of maternal diet in rats on feed consumption of the offspring. J Nutr 1970; 100:157-64.
- Schmidt B, Gabbai AA, Oliveira ASB, Braga Jr MB, Castelo Filho A, Laredo Filho J. Biopsia muscular, nova metodologia. A doença dos "farabeus". Rev Bras Ortopedia 1988; 23:21-6.
- Sokal RR, Rolf J. Biometry. San Francisco: Freeman; 1969.
- Berquó ES, Souza JMP, Gotlie BLD. Bioestatística. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda; 1980.

17. Pearson K. On the theory of contingency and its relation to association and normal correlation. London: Draper's Company Research Memoirs; 1904.
18. Fisher RA. Statistical methods for research workers. New York: Hafner Publishing Co; 1948.
19. Sarnat HB. Developmental disorders of muscle. In: Mastaglia FL, Walton SJ, eds. *Skeletal Muscle Pathology*. New York: Churchill Livingstone; 1982. p. 140-60.
20. Chopra JS, Mehta J, Rana SV, Dhand UK, Mehta S. Muscle involvement during postnatal protein calorie malnutrition and recovery in rhesus monkeys. *Acta Neurol Scand* 1987; 75:234-43.
21. Ward SS, Stickland NC. Why are the slow fast muscle differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle & Nerve* 1991; 14:259-67.
22. Dastur DK, Baver SM, Manghani DK. Changes in muscle in human malnutrition, with an emphasis on the fine structure in protein-caloric malnutrition. *Prog Neuropathol* 1979; 4:299-318.
23. Goodman MN, Mceleney MA, Ruderma NB. Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. *Am J Physiol* 1981; 241:E321-7.
24. Rowe RWD, Goldspink G. Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. *J Anat* 1969; 104:519-30.
25. Goldspink G. Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. In: Bourne GH. *Structure and function of muscle*. 2ª ed. New York: Academic Press; 1972. p.28-45.
26. Ihemelandu EC. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta Anat* 1985; 121:89-93.
27. Stickland NC, Widdowson EM, Goldspink G. Effects of energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs. *Br J Nutr* 1975; 34:421-8.
28. Hegarty PVJ, Allen CE. Effect of prenatal runtting on the postnatal development of skeletal muscle in swine and rats. *J Anim Sci* 1978; 46:1634-40.
29. Goldspink G, Ward PS. Changes in rodent muscle fibre types during postnatal growth, undernutrition and exercise. *J Physiol London* 1979; 296:453-69.
30. Dwyer CM, Stickland NC. Does the anatomical location of the muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *J Anat* 1992; 181:373-6.
31. Ontell M, Dunn RF - Neonatal muscle growth: a quantitative study. *Am J Anat* 1978; 152:539-56.
32. McLennan IS. Hormonal regulation of myoblast proliferation and myotube production in vivo: Influence of prostaglandins. *J Exp Zool* 1987; 141:237-45.
33. Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles. *Development* 1987; 100:395-409.
34. Wilson SJ, Ross JJ, Harris AJ. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development* 1988; 102:815-21.
35. Bedi KS, Birgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham AC. Early life undernutrition in rats: 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refeed adult animals. *Br J Nutr* 1982; 47:417-31.
36. Penney RK, Prentis PF, Marshall PA, Goldspink G. Differentiation of muscle and the determination of ultimate tissue size. *Cell Tissue Res* 1983; 228:375-88.
37. Singh NS, Agrawai SP, Dikshit SK. Serum enzyme in nutritional muscular wasting. *Indian J Pediatr* 1972; 39:383-31.
38. Kumar A, Ghai OP, Singh N. Delayed nerve conduction velocities in children with protein-malnutrition. *J Pediatr* 1977; 90:149-50.
39. Platt BS, Stewart JRC. Effects of protein-calorie deficiency on dogs: 2. Morphological changes in the nervous system. *Dev Med Child Neurol* 1969; 11:174-92.
40. Sima A. Studies on fibre size in developing sciatic nerve and rehabilitated rats. *Acta Physiol Scand* 1974; 406:1-55.
41. Epstein HF, Bernstein SI. Genetic approaches to understanding muscle development. *Dev Biol* 1992; 154:232-44.
42. Hershey JWB, Duncan R, Etchison DO, Milburn SC. The role of mammalian initiation factors in translational control. In: Clark BFC, Petersen HU, eds. *Gene Expression*. Munksgaard, Alfred Benzon Symposium, 19, Copenhagen; 1984. p.58-76.
43. Pichard C, Vaughan C, Struk R, Armstrong RL, Jeejeebhoy KN. The effect of dietary manipulations (fasting, hypocaloric feeding and subsequent refeeding) on rat muscle energetics as assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Invest* 1988; 82:895-901.
44. Mehta J, Chopra JS, Mehta S, Nain CK, Bhagwat AG, Dhand U et al. Ultrastructure and activity of some enzymes of energy metabolism of skeletal muscle in experimental energy deficiency. *Ann Nutr Metab* 1987; 31:35-46.
45. Mijan De La Torre A, Madapallimattam A, Cross A, Armstrong RL, Jeejeebhoy KN. Effect of fasting, hypocaloric feeding and refeeding on the energetics of stimulated rat muscle as assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Invest* 1993; 92:114-21.
46. Williams RS, Harlan W. Effects of inhibition of mitochondrial protein synthesis in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1987; 253:C866-71.
47. Dickerson JWT, McCance RA. Severe undernutrition in growing and adult animals: 3. Avian skeletal muscle. *Brit J Nutr* 1960; 14:331-38.
48. McRussel DR, Atwood HL, Whittaker JS, Itakura T, Walker P, Mickle DAG et al. The effect of fasting and hypocaloric diets on the functional and metabolic characteristics of rat gastrocnemius muscle. *Clin Sci Lond* 1984; 67:185-94.
49. Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Mechanical relation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J Physiol* 1980; 299:465-84.
50. Waas W, Hasselback W. Interference of nucleoside diphosphates and inorganic phosphate with nucleoside-triphosphate-dependent calcium fluxes and calcium-dependent nucleoside-triphosphate hydrolysis in membranes of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Eur J Biochem* 1981; 116:601-8.
51. National Research Council. Control of diets in Laboratory animal experimentation. *Nutr Abstracts Rev* 1979; B49:413-9.

Endereço para correspondência:

Dra. Fernanda Luísa Ceragioli Oliveira  
Rua Botucatu, 703 - São Paulo - SP - CEP 04023-062  
Telefax 11 549.8993