

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO DE CORPO INTEIRO SOBRE AS
PROTEÍNAS CONTRÁTEIS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DE RATOS PRECOCEMENTE DESNUTRIDOS**

WILSON VIANA DE CASTRO MELO

Orientador: Prof. Dr. Ademir Amaral

Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Mônica Ferraz

Recife, PE

Outubro, 2016

WILSON VIANA DE CASTRO MELO

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO DE CORPO INTEIRO SOBRE AS
PROTEÍNAS CONTRÁTEIS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DE RATOS PRECOCEMENTE DESNUTRIDOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologias Energéticas e Nucleares para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Área
de concentração: Dosimetria e Instrumentação
Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Amaral

Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Mônica Ferraz

Recife, PE

Outubro, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

M528e

Melo, Wilson Viana de Castro.

Efeitos da irradiação de corpo inteiro sobre as proteínas contráteis do músculo esquelético de ratos precocemente desnutridos.

/ Wilson Viana de Castro Melo. - Recife: O Autor, 2016.

93 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.

Coorientadora: Profa. Dra. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2016.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. Irradiação de corpo total. 2. Desnutrição. 3. Músculo. 4. Proteína. 5. Modelo animal. I. Amaral, Ademir de Jesus, orientador. II. Lambertz, Karla Mônica Ferraz Teixeira, coorientadora. III. Título.

CDD 621.48 (21. ed.)

UFPE
BDEN/2017-03

Efeitos da Irradiação de Corpo Inteiro nas Proteínas Contráteis do Músculo Esquelético em Ratos Precocemente Desnutridos

Wilson Viana de Castro Melo

APROVADA EM: 31.10.2016

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral – DEN/UFPE

Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra – DEN/UFPE

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes – DBR/UFPE

Profa. Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos – CAV/UFPE

Profa. Dra. Ana Elisa Toscano – CAV/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

MENSAGEM

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que
somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e,
acima de tudo, importa o que fazemos de nós!

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai, o homem mais extraordinário
que conheci nesta vida, aquele de quem tive a benção divina
de ser seu filho.

AGRADECIMENTOS

Talvez esta seja a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não possa ser explicada por uma análise estatística e não é pelo valor de p que descobrimos a significância das pessoas em nossa trajetória.

O principal agradecimento dedico a DEUS, pela minha vida e por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições estiveram presentes me ajudando, apoiando e incentivando. Agora que ela foi finalizada não poderia deixar de agradecer:

Meus pais, filhos, irmãos e esposa que, com toda certeza, me incentivaram e torceram pela minha conquista.

Os professores Karla Lambertz, Daniel Lambertz e Ademir Amaral por me confiarem esta pesquisa e acreditarem no meu trabalho.

O Departamento de Nutrição da UFPE pela disponibilidade do biotério e dos laboratórios.

O grande profissional e mestre Edeones França pelos ensinamentos de como cuidar e manejar os animais no biotério.

O Departamento de Energia Nuclear da UFPE e os professores e funcionários do PROTEN, meus reconhecimentos.

Os meus colegas de curso Márcio, Juliana, Carol e Ruanita pelos bons e maus momentos que passamos juntos.

As minhas amigas Thaysa e Tércya por tudo que aprendemos juntos.

Os colegas de trabalho Iberê, Francisco, Saulo, Carol, João Henrique, Kelly, Antônio, Raquel, Adriano, Claudia e Mariana pela grande ajuda e incentivo.

Os colegas Maria Cláudia, José Luiz e Viviane pela ajuda nos laboratórios e fabricação de rações.

O Centro de Radioterapia de Pernambuco por possibilitar a irradiação dos animais.

Os físicos Aristides e Djalma pela enorme ajuda durante as irradiações.

O meu Comitê de Acompanhamento representado pelas Professoras Ana Elisa Toscano,

Edvane Silva e Rhowena Matos pela grande contribuição e orientações durante estes anos.

A toda equipe do Laboratório de Imunomodulação e Novas abordagens Terapêuticas - LINAT/UFPE pelos conhecimentos adquiridos, pela troca de experiências e pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

E a todos que de forma direta ou indireta ajudaram-me a concluir este trabalho com êxito.

RESUMO

Utilizando modelo animal, esta pesquisa buscou avaliar os efeitos a longo prazo da radiação ionizante sobre as proteínas contráteis (actina e miosina) de dois diferentes músculos esqueléticos, Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL), em ratos submetidos à desnutrição precoce. Para tanto, ratos da linhagem Wistar foram divididos em quatro grupos experimentais: Normonutrido; Desnutrido; Normonutrido-irradiado e Desnutrido-irradiados, compostos por 9 animais cada. De acordo com o grupo a que pertenciam, para a simulação de desnutrição perinatal foi empregada dieta a 8% de caseína, enquanto que em relação aos grupos de animais a serem irradiados de corpo inteiro (Total Body Irradiation – TBI), o protocolo utilizado foi o de exposição, aos 28 dias, a uma única dose de 2,5 Gy, a partir de uma fonte de cobalto-60 (taxa de dose 75 cGy/min). Aos 90 dias de idade, todos os animais foram eutanasiados por decapitação, seguido de coleta de sangue e remoção dos músculos. As proteínas séricas foram quantificadas pelo Método do Biureto e Verde de Bromocresol, enquanto que expressão das proteínas contráteis musculares foram mensuradas pela técnica de Western Blotting. Os dados foram submetidos a testes de homogeneidade e normalidade, teste t de Student e análise de variância bidimensional (ANOVA 2-fatores) seguida de teste de comparação múltiplas de *Tukey*. Os resultados demonstraram que: a TBI e a desnutrição, conjuntamente, provocaram perda de massa corporal; isoladamente, a TBI levou à uma redução na concentração das proteínas séricas; a desnutrição provocou aumento na expressão de miosina I nos músculos Sóleo e EDL; a TBI provocou aumento na expressão de miosina IIB nos músculos Sóleo e EDL; a desnutrição e a TBI agindo conjuntamente provocaram aumento na expressão de miosina IIB no músculo EDL. A presente investigação aponta para a necessidade de mais estudos abrangendo diferentes doses e idades distintas, permitindo extrapolar para crianças e jovens que são submetidos a tratamento envolvendo TBI, no sentido de prevenir condições patológicas na idade adulta e minimizar os efeitos deletérios da radiação ionizante sobre a função muscular.

Palavras-chaves: Irradiação de corpo total. Desnutrição. Músculo. Proteína. Modelo animal.

ABSTRACT

Using an animal model, this study was designed to evaluate long-term effects of ionizing radiation to the contractile proteins (actin and myosin) of two different skeletal muscles, Soleus and Extensor Digitorum Longus (EDL) in rats with early malnutrition. For this, Wistar rats were divided into four groups: Normal nourished; Malnourished; Irradiated-Normal nourished and Irradiated-Malnourished, composed of nine animals each group. According to the group to which they belonged, for the simulation of perinatal malnutrition was employed diet to 8% casein, while in relation to the groups of animals that were submitted to TBI (Total Body Irradiation) the protocol used was the exposure, after 28 days, with a single dose of 2.5 Gy, from a cobalt-60 source (dose rate: 75 cGy / min). At 90 days of age, all animals were sacrificed by decapitation, followed by blood collection and removal of the muscles. Serum proteins were quantified by Biuret method and Bromocresol Green, while expression of muscle contractile proteins were measured by the technique of Western blotting. The data were subjected to homogeneity and normality tests, Student's t-test and analysis of two-dimensional variance (ANOVA two-ways) followed by Tukey's multiple comparison test. The results showed that: both TBI and malnutrition caused loss of body weight; isolatedly, TBI led to a reduction in the concentration of serum proteins; malnutrition caused an increase in myosin-I expression in Soleus and EDL muscles; TBI caused an increase in myosin-IIB expression in Soleus and EDL muscles; malnutrition and TBI acting together provoked an increase in myosin-IIB expression in EDL muscle. This research points to the need for more detailed studies with different doses at different ages, in order thus, extrapolate for children and young people who are submitted to treatment involving TBI, in the sense to prevent pathological conditions in adulthood and minimize the deleterious effects of ionizing radiation on muscle function.

Keywords: Total body irradiation. Malnutrition. Muscle. Protein. Animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação das fibras musculares estriadas.	23
Figura 2 - Os diferentes tecidos conectivos presentes no músculo	24
Figura 3 - Representação esquemática da miofibrila mostrando um sarcômero	26
Figura 4 - Dispositivo utilizado para irradiação de ratos com 80 g de massa corporal e capacidade para quatro animais.	43
Figura 5 - Amostra de tecido muscular em tubo de 15 ml com tampão de lise citoplásmica e inibidor de protease.	45
Figura 6 - Trituração do tecido muscular	46
Figura 7 - Imagem de filme radiográfico contendo bandas de interesse	48
Figura 8 - Fluxograma do processo experimental	49
Figura 9 - Valores médios da massa corporal aos 30, 60 e 90 dias de vida para os quatros grupos experimentais.	51
Figura 10 - Evolução do ganho de massa corporal dos animais pertencentes aos grupos N e NI referente ao período entre 30º e 90º dia de vida.....	52
Figura 11 - Evolução do ganho de massa corporal dos animais pertencentes aos grupos D e DI referente ao período entre 30º e 90º dia de vida.....	53
Figura 12 - Boxplots referentes à quantidade de proteínas totais e Albumina encontradas no soro sanguíneo dos quatros grupos experimentais aos 90 dias de vida.	54
Figura 13 - Expressão de actina em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.	58
Figura 14 - Expressão de miosina I em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.	60
Figura 15 - Expressão de miosina IIB em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.	62
Figura 16 - Expressão de actina em amostras de músculo EDL de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.	65

Figura 17 - Expressão de miosina I em amostras de músculo EDL de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.	66
Figura 18 - Densitometria ótica de bandas representando a proteína miosina IIB no músculo EDL de ratos com 90 dias após desnutrição e TBI de 2,5 Gy nos quatros grupos experimentais.	67
Figura 19 - Monitoramentos recomendados e práticas preventivas para sobreviventes após o transplante hematopoiético celular a longo prazo.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composições das dietas experimentais	41
Tabela 2 - Anticorpos primários	47
Tabela 3 - Valores médios de massa corporal em gramas compreendendo o período de 30 a 90 dias de idade.....	50
Tabela 4 - Valores médios de proteínas totais e albumina plasmáticas aos 90 dias de vida. ...	54
Tabela 5 - Valores médios da quantificação relativa da densidade ótica das bandas correspondendo as proteínas contrateis do músculo Sóleo de ratos com 90 dias após desnutrição perinatal e TBI de 2,5 Gy normalizados por GAPDH.....	57
Tabela 6 - Valores médios das quantidades das proteínas contráteis no músculo EDL de ratos com 90 dias após desnutrição perinatal e TBI com dose de 2,5 Gy normalizados por GAPDH.....	64
Tabela 7 - Efeitos aos 90 dias dos tratamentos aplicados neste estudo	69

LISTA DE ABREVIATURAS

TBI	Total Body Irradiation
Gy	Gray
EDL	Extensor Longo dos Dedos
HLA	Human Leukocyte Antigen
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Myf5	Fator Miogênico 5 (gene)
MyoD	Muscle Differentiation (gene)
kDa	Quilodalton
MHC	Myosin Heavy Chain
MLC	Myosin Light Chain
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatase
BCA	Ácido Bicinconínico
nm	Nanômetro
Ca ²⁺	Íon Cálcio
°C	Grau Celsius
C57Bl/6N WT	Estripe Endogâmica de Camundongos
C57BL/10	Estripe Endogâmica de Camundongos
SNP	Nitroprussiato de Sódio
mdx	Mutação do Gene da Distrofina
Å	Angstrom
AIN-93G	American Institute of Nutrition – Diet to support growth
HCl	Ácido Clorídrico
MeV	Megaeletron-volt
g	Grama
ml	Mililitro
rpm	Rotações por Minuto
CO ₂	Dióxido de Carbono
LABTEST	Indústria Brasileira de Diagnósticos – LABTEST Diagnóstica S.A.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
dl	Decilitro

μl	Microlitro
NaCl	Cloreto de Sódio
mM	Milimol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
pH	Potencial Hidrogeniônico
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
V	Volt
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween® 20
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SE	Side effect
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Terapia com Irradiação Total do Corpo	18
2.2 O Músculo Esquelético	21
2.2.1 Organização e Microestruturas	24
2.2.2 Tipologia.....	27
2.2.3 Efeitos da desnutrição sobre o músculo esquelético	29
2.2.4 Efeitos da Radiação Ionizante sobre o Músculo Esquelético	32
2.2.4.1 Alterações no Metabolismo Celular	33
2.2.4.2 Repercussões sobre a atividade das Células Satélites	34
2.2.4.3 Formação de Fibrose e Atrofia Muscular	35
2.2.4.4 Regeneração do Tecido	36
2.3 O Modelo Animal	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Caracterização da pesquisa	39
3.2 Local do estudo	39
3.4 Irradiação	42
3.5 Quantificação de Proteínas Totais e Albumina no soro sanguíneo.....	43
3.6 Quantificação das expressões das proteínas contráteis musculares	44
3.6.1 Extração das proteínas	45
3.6.2 Fracionamento das proteínas, incubação e revelação das membranas	46
3.6.3 Análise da densidade óptica	47
3.7 Análises estatísticas	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Acompanhamento do Perfil Ponderal de Ganho de Massa Corporal	50
4.2 Proteínas Totais e Albumina no Soro Sanguíneo	54
4.3 Expressão das Proteínas Contráteis Musculares.....	56
4.3.1 Músculo Sóleo	57
4.3.1.1 Análise da expressão da proteína actina	57
4.3.1.2 Análise da expressão da proteína miosina I.....	59
4.3.1.3 Análise da expressão da proteína miosina IIB.....	61

4.3.2 Músculo Extensor Longo dos Dedos.....	64
4.3.2.1 Análise da expressão da proteína actina	64
4.3.2.2 Análise da expressão da proteína miosina I.....	65
4.3.2.3 Análise da expressão da proteína miosina IIB.....	67
5. CONCLUSÕES	73
6. PERSPECTIVAS	74
REFERÊNCIAS	74
ANEXO I.....	91
ANEXO II	92

1. INTRODUÇÃO

Entre as modalidades terapêuticas que utilizam as radiações ionizantes, a irradiação de corpo inteiro (do inglês TBI =total body irradiation) é amplamente empregada no tratamento de determinadas doenças oncológicas, especialmente em doenças hematológicas, sendo fundamental em transplantes de medula óssea e de células tronco (GIORDANI *et al.*, 2004). Particularmente, quando o nível de dose entregue ao paciente ao final do tratamento é da ordem de 2 Gy¹, este tipo de radioterapia é denominada TBI de baixa dose (ou do inglês, low-dose TBI) (WILLS *et al.*, 2016).

Apesar dos reconhecidos benefícios dessa radioterapia, a incidência de complicações induzidas pela TBI é elevada, tendo como efeitos colaterais comuns a toxicidade renal, a catarata e a redução funcional da glândula pituitária (ONAL *et al.*, 2012). Além disto, efeitos secundários induzidos por radiação ionizante dependem do perfil genético e epigenético, que refletem diretamente na radiosensibilidade individual, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de câncer (MENDONÇA *et al.*, 2013).

A literatura científica apresenta vários estudos sobre os efeitos radioinduzidos resultantes da exposição de corpo inteiro em humanos (IAEA, 2010; LUCKEY, 2011; AZEVEDO, 2009). Todavia, os efeitos biológicos a longo prazo da interação da radiação com o tecido muscular, mais especificamente no músculo esquelético são relativamente raros, talvez devido à complexidade de estudos longitudinais com humanos, por apresentarem fortes restrições, como a exigência de maioridade por exemplo, que dificulta a abordagem precoce (BRASIL, 1988).

Estudos empregando modelo animal mostraram que a irradiação de corpo inteiro provoca proteinúria, diminuindo os níveis sérios de proteínas totais e albumina (NWOKOCHA *et al.*, 2012b; NWOKOCHA *et al.*, 2012a). Enquanto que um estudo de revisão destacou que o músculo esquelético é sensível e sofre efeitos da radiação ionizante, que age diretamente sobre sua estrutura celular, refletindo na quantidade ou tipo das proteínas musculares (VIANA *et al.*, 2015).

Por outro lado, pesquisas envolvendo experimentos com animais e seres humanos têm constatado que a desnutrição interfere diretamente sobre o crescimento e o desenvolvimento do corpo, em especial sobre a massa corporal. Tais efeitos desencadeiam uma sequência de

¹ Gy (gray) é a unidade de dose absorvida no Sistema Internacional de Unidades (SI), equivalente a quantidade de energia de radiação ionizante absorvida por unidade de massa do volume irradiado, ou seja: 1Gy=J/kg (IAEA,2010).

mecanismos de adaptação, especialmente sobre o sistema musculoesquelético, tais como alteração do tipo de fibra e estrutura dos sarcômeros, além da perda de massa muscular e alterações nas propriedades contráteis e elásticas (TOSCANO *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012). Nesse sentido, sabe-se que a desnutrição proteica tem grande influência sobre a musculatura esquelética, pois a perda da massa muscular, como consequência metabólica deste processo, pode ser considerada um mecanismo homeostático, promovendo uma diminuição das proteínas musculares (VOLTARELLI e MELLO, 2008).

Se em estudos experimentais, verificou-se que músculos de ratos jovens que foram submetidos precocemente à desnutrição proteica chegam à idade adulta sem recuperar totalmente suas funções biomecânicas e seu trofismo (TOSCANO *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2010), qual o resultado de uma dupla agressão, ou seja, o uso da radiação ionizante incidindo sobre músculos de um indivíduo desnutrido? A extrapolação dessas investigações a partir de modelos animais poderá contribuir para reduzir os efeitos deletérios sobre a função muscular resultantes da exposição à radiação, com consequente aumento da performance motora desses pacientes e melhoria de qualidade de vida.

Deste modo, esta pesquisa se justifica por avaliar músculos de ratos submetidos ou não à desnutrição após exposição à radiação ionizante de corpo inteiro para, a partir dos resultados observados, sugerir futuras estratégias de intervenção em seres humanos.

Diante do exposto, e dentro da perspectiva de que a radioterapia é uma das formas de tratamento intensamente utilizada no combate do câncer e que leva a diferentes efeitos colaterais, a pergunta condutora é: **a radiação ionizante diminui a expressão das proteínas contráteis do músculo esquelético em indivíduos eutróficos ou precocemente desnutridos que fazem uso deste tipo de tratamento?**

Neste contexto, esta pesquisa objetiva avaliar os efeitos a longo prazo da radiação ionizante sobre as proteínas contráteis de dois diferentes músculos esqueléticos, um postural (Sóleo) e outro não-postural (Extensor Longo dos Dedos–EDL) em ratos submetidos ou não à desnutrição precoce.

Com isso, mais especificamente, esta pesquisa pretende: acompanhar o perfil ponderal de ganho de massa corporal; quantificar as concentrações séricas de proteínas totais e de albumina; quantificar a expressão das proteínas contráteis musculares (actina, miosina I, miosina IIb); identificar a predominância do tipo de fibra muscular nos diferentes músculos e comparar os efeitos da radiação sobre estes parâmetros entre os animais eutróficos e os precocemente desnutridos, baseada na hipótese de que a TBI e a desnutrição agem

negativamente sobre as proteínas contráteis musculares reduzindo a quantidade de suas expressões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terapia com Irradiação Total do Corpo

Dentre as terapias que utilizam a radiações ionizantes, a irradiação de corpo inteiro (TBI) é uma técnica terapêutica normalmente empregada como parte do condicionamento do transplante de medula óssea, podendo ser aplicada no tratamento de persistência/recidiva de leucemia, de linfoma e de mieloma múltiplo, e alguns tumores sólidos (neuroblastomas, sarcomas de Ewing, plasmocitomas) (WILLS *et al.*, 2016). Assim, a TBI tem por objetivo eliminar ou reduzir população de células tumorais e imunossupressão dos pacientes o suficiente para reduzir o risco de rejeição da medula óssea transplantada, fornecendo uma dose uniforme de radiação para o corpo inteiro, penetrando em áreas como o sistema nervoso central e testículos, onde a quimioterapia tradicional é ineficaz (WILLS *et al.*, 2016).

TBIs definidas como de baixas doses correspondem a tratamentos que empregam níveis de dose que variam de 2 a 8 Gy, aplicadas de 1 a 4 frações combinadas com quimioterapia. Em procedimentos com resgate da medula óssea ou com sangue periférico de parentes totalmente HLA (Human Leukocyte Antigen) compatíveis, varia entre 8 e 10 Gy, quando se usa fração única (GIORDANI *et al.*, 2004). Quando a dose é hiperfracionadas, utiliza-se 2 Gy duas vezes ao dia, totalizando 12 Gy, ou 1,2 Gy em três sessões ao dia, sendo que neste caso a dose total é de 13,2 Gy. Esses regimes de condicionamento são eficazes para o transplante, principalmente em pacientes que não toleram mieloablação devido à idade ou comorbidades (GIORDANI *et al.*, 2004; WILLS *et al.*, 2016).

Sem acompanhamento médico adequado, a TBI é uma terapia potencialmente fatal. Imediatamente após a irradiação, os sintomas agudos mais comuns encontrados são náuseas, vômitos, perda de apetite, diarreia, dor de cabeça e síndrome da fadiga (GIORDANI *et al.*, 2004). Terapias para controlar estes efeitos secundários incluem a hidratação intravenosa, antimucosites e agentes antieméticos. A longo prazo, a TBI pode apresentar complicações como neoplasias secundárias, infertilidade, doenças cardiovasculares, pneumonite, nefrite, cataratas, défices de aprendizagem e atraso no crescimento em crianças (WILLS *et al.*, 2016).

Além disto, a radioterapia, em qualquer parte do sistema digestório, é capaz de causar

efeitos secundários relacionados ao estado nutricional do paciente. Crianças com câncer e desnutrição têm prognóstico menos favorável e maior risco de recidiva precoce para tolerar tratamento com TBI associada, quando comparadas com crianças em estado nutricional normal (MURRY *et al.*, 1998; UNSAL *et al.*, 2006).

Apesar da frequência destes efeitos, uma avaliação nutricional em pacientes submetidos à radioterapia não é rotina presente. A desnutrição, como uma comorbidade em pacientes com câncer, tem sido reconhecida e sua prevalência varia de 8 a 84% dos pacientes, dependendo do método utilizado para a sua avaliação (UNSAAL *et al.*, 2006).

A quantificação dos níveis de proteínas séricas (proteínas totais e albumina) na avaliação de desnutrição em pacientes enfermos tem sido relatada na literatura como um importante e confiável medidor. Além disto, a albumina sérica é o indicador bioquímico de desnutrição mais utilizado, sendo considerado também um bom preditor de mortalidade e morbidade, pois a hipoalbuminemia é um sinal de desnutrição proteica, quer seja devido à desnutrição per se “Kwashiorkor”, ou induzida por alcoolismo, parasitoses ou doenças malignas (SANTOS *et al.*, 2004; FONTOURA *et al.*, 2006).

Apesar de vários efeitos secundários adversos associados à TBI, o tratamento de várias formas de leucemia e linfoma conjuntamente com transplante, continua sendo uma das mais bem-sucedidas formas de terapia. Entretanto, as elevadas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a este tipo de tratamento implicam na necessidade de mais investigações sobre os efeitos de uma baixa dose de irradiação não mieloablativa, particularmente para pacientes idosos e crianças (WILLS *et al.*, 2016).

Embora todas as áreas do corpo humano sejam susceptíveis a danos pela radiação, os diversos tecidos apresentam tolerâncias diferentes à irradiação. As células mais radiosensíveis do corpo são aquelas que possuem alta taxa de proliferação e são bem oxigenadas. Neste cenário, os sistemas mais radiosensíveis são: a medula óssea, sistema reprodutivo e gastrointestinal, pele, músculos e cérebro (HALL, 1994; RYAN, 2012).

Os efeitos das radiações ionizantes aos quais os tecidos estão sujeitos podem receber denominações em função da dose e forma de resposta, em função do tempo de manifestação e do nível orgânico atingido. Assim, em função da dose e forma de resposta, são classificados em determinísticos e estocásticos; em termos do tempo de manifestação, em imediatos e tardios; em função do nível de dano, em somáticos e genéticos (hereditários) (TAUHATA *et al.*, 2003).

Os efeitos determinísticos são aqueles que certamente ocorrerão quando um determinado limiar de dose é ultrapassado, nível também conhecido como D₁₀₀, sendo que sua

severidade aumenta com a dose absorvida, causando morte celular não compensada pela reposição ou reparo, com prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão. Isto significa que estes efeitos são produzidos por doses elevadas, acima do limiar, onde a severidade ou gravidade do dano aumenta com a dose aplicada (TAUHATA *et al.*, 2003; AZEVEDO, 2009). Já os efeitos estocásticos (ou probabilísticos) são definidos como aqueles que também podem ocorrer a partir de um limiar de dose. Entretanto, diferentemente dos efeitos determinísticos, os efeitos estocásticos não surgem obrigatoriamente a partir desse limiar de dose, sendo mais associado ao acaso, isto significa, que doses pequenas, abaixo dos limites estabelecidos por normas e recomendações de proteção radiológica, podem induzir tais efeitos. Ademais, a severidade dos efeitos estocásticos independe do nível de dose absorvida (TAUHATA *et al.*, 2003).

Os efeitos imediatos são observados em horas, dias ou semanas, após a irradiação. Eles podem ser produzidos apenas com uma grande quantidade de radiação, absorvida em uma grande área do corpo e em curto período. Enquanto que os efeitos tardios são observados depois de anos, podem ser causados por grandes exposições em curto espaços de tempo ou por pequenas exposições em longo período. Se as doses forem muito altas, predominam os efeitos imediatos, e as lesões serão severas ou até letais. Para doses intermediárias, predominam os efeitos imediatos com grau de severidade menor, e não necessariamente permanentes. Poderá haver, entretanto, uma probabilidade grande de lesões severas a longo prazo. Para doses baixas, não haverá efeitos imediatos, mas há possibilidade de lesões a longo prazo (TAUHATA *et al.*, 2003).

Os efeitos somáticos afetam apenas a pessoa irradiada e dependem da dose absorvida, da taxa de absorção da energia da radiação, da região e da área do corpo irradiada. Por outro lado, os efeitos que surgem no descendente da pessoa irradiada, como resultado do dano produzido pela radiação em células dos órgãos reprodutores são classificados como hereditários, resultando em alguma mutação genética, podendo afetar as futuras gerações do indivíduo irradiado podendo ocorrer uma alteração da informação genética codificada. As células contendo as informações genéticas danificadas, mais tarde irão se tornar células reprodutivas, sendo assim, a transferência dessas informações alteradas será inevitável, podendo continuar por muitas gerações (TAUHATA *et al.*, 2003).

Os efeitos biológicos da radiação podem ter origem nos danos causados à molécula de DNA, como a quebra da dupla fita, resultando em alterações morfológicas e funcionais de tecidos ou órgãos (SEGRETO e SEGRETO, 1997; BROWN e RZUCIDLO, 2011). Lesões de

pele, tais como eritema e necrose, e lesões oculares (catarata) são exemplos típicos de efeitos determinísticos, enquanto o câncer radioinduzido é o mais estudado efeito estocástico (VALENTIN, 2000; BROWN e RZUCIDLO, 2011; RYAN, 2012). Em um estudo com médicos que trabalharam com raios-X, usando dados de exposição, entre 1970 e 2001, com base em dosímetros, Jartti e colaboradores (2006) encontraram um risco aumentado de câncer de mama feminina.

Em um estudo retrospectivo com 108 homens e 78 mulheres que receberam 12 a 13,5 Gy de TBI fracionada em 6 sessões, Thomas e colaboradores (2001) constataram que as complicações a longo prazo não eram sintomáticas na maioria dos pacientes, permitindo-lhes uma boa qualidade de vida. Nesse estudo, foram observadas anomalias funcionais do pulmão em 19% dos casos, sempre sem efeito clínico, perturbações hormonais da tireoide em 7%, catarata em apenas 10% dos casos e raros casos de hipotireoidismo.

Outros estudos têm investigado os danos induzidos pela radiação em diversos tecidos, a longo e curto prazo. Alguns relatos sobre os efeitos da radiação no tecido muscular indicam que as lesões resultantes podem persistir por anos após a irradiação, por meio de vários mecanismos fisiopatológicos, como inchaços endoteliais e necroses (HSU *et al.*, 1998). Em uma revisão sobre dados clínicos e experimentais referentes à resposta do músculo e nervos após radioterapia, Gillette e colaboradores (1995) destacam vários estudos em diferentes espécies animais, onde a atrofia muscular e a fibrose apareceram após alguns meses da aplicação da dose de radiação, sempre acompanhadas de lesões vasculares.

Embora a musculatura esquelética humana adulta seja altamente resistente à radiação no que tange às alterações morfológicas, necroses tardias no músculo são observadas após administração de doses terapêuticas de radiação. Esta morte celular tardia pode ser principalmente devido aos danos nos capilares sanguíneos e ao tecido conjuntivo, porém existem poucos estudos sobre o mecanismo de como o músculo esquelético se adapta após ser exposto à radiação (OLIVÉ *et al.*, 1995; JURDANA, 2008).

2.2 O Músculo Esquelético

O músculo esquelético dos vertebrados é um tecido composto por fibras musculares cilíndricas individuais heterogêneas, diversificadas em tamanho, forma e conteúdo de proteína contrátil. Esta heterogeneidade deriva de distintas classes de células progenitoras miogênicas (MESSINA e COSSU, 2009). Durante a embriogênese, os músculos esqueléticos formam-se a

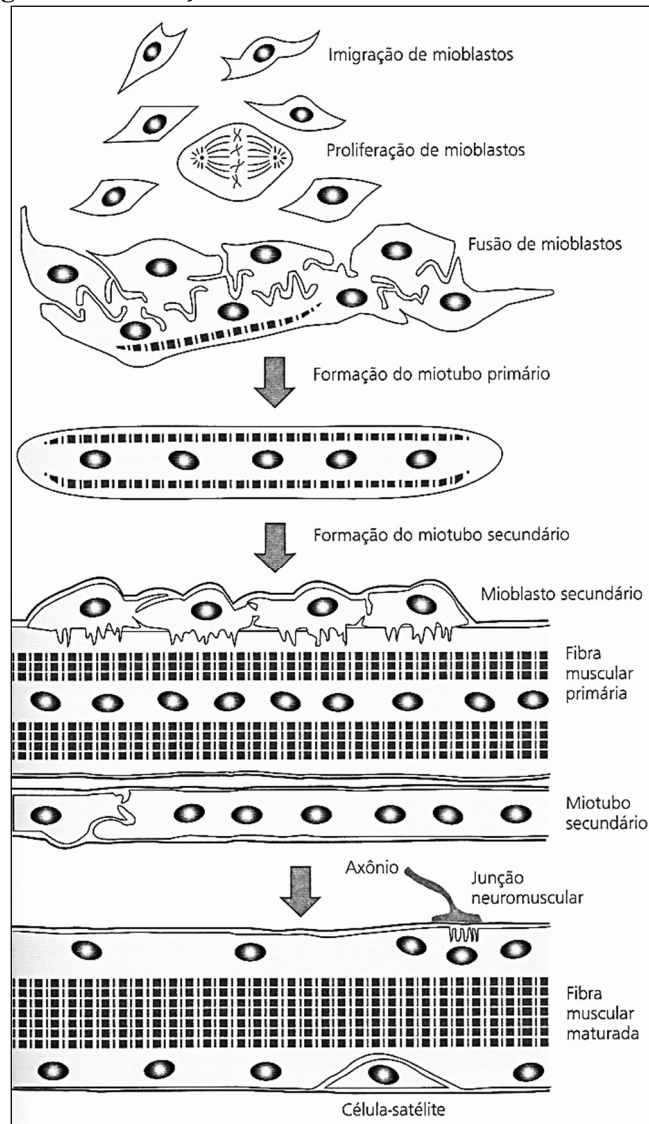
partir de células progenitoras, os somitos originados da parte mais posterior e imatura da placa do mesoderma paraxial. As células dos somitos recém-formados rapidamente se diferenciam para formar aglomerados de músculos (BUSCHER e IZPISUA BELMONTE, 1999; BAILEY *et al.*, 2001; BUCKINGHAM *et al.*, 2003; ALBERTS *et al.*, 2004).

Quando as células mesenquimais são estimuladas para formar as células musculares, emigram dos somitos e misturam-se com outras classes de células, mantendo sua expressão de proteínas de regulação gênica específica (Myf5 e MyoD), e quando chega o momento da diferenciação, transformam-se em mioblastos (ALBERTS *et al.*, 2004). Os mioblastos fundem-se para formar os miotubos, iniciando a síntese das proteínas musculares necessárias para sua estrutura e função e organizam-se em feixes cilíndricos e multinucleados, constituindo assim a fibra muscular (ONOFRE-OLIVEIRA, 2009). O desenvolvimento muscular envolve, desta forma o alinhamento em cadeia dos mioblastos para formar os miotubos (FIGURA 1).

A formação dos miotubos ocorre a partir de dois eventos distintos. Primeiramente, ocorre a formação dos miotubos primários, os quais fornecem um suporte para a posterior formação dos miotubos secundários a partir da proliferação e fusão de mioblastos adjacentes aos miotubos primários. Posteriormente, ocorre a separação dos miotubos primários e secundários com a diferenciação das fibras primárias e secundárias, em seguida os núcleos migram para a região periférica e as miofibrilas passam a ocupar todo o sarcoplasma (SILVA e CARVALHO, 2007).

Durante o processo da miogênese, alguns mioblastos não se fundem e permanecem quiescentes indiferenciados entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal (SILVA e CARVALHO, 2007). Essas células precursoras de músculo adulto são conhecidas como células satélites, pequenas células mononucleadas encontradas ao longo da fibra muscular, sugerindo que a origem destas células seja diferente da origem dos músculos embrionários e podem ter origem de células endoteliais. As células satélites desempenham um papel essencial nos processos de crescimento pós-natal do músculo, na regeneração e na hipertrofia muscular. Quando o músculo é lesionado ou sofre estresse intenso, as células satélites quiescentes são ativadas, passam mitoticamente por sucessivas replicações, formando um conjunto de células precursoras que finalmente fundem-se com fibras musculares já existentes ou recém-formadas (BAILEY *et al.*, 2001; BUCKINGHAM, 2001; BUCKINGHAM *et al.*, 2003).

Figura 1- Formação das fibras musculares estriadas.



As células precursoras originam diferentes populações de mioblastos, que se alinha e se fundem formando os miotubos primários fornecendo suporte para a subsequente formação dos miotubos secundários e a fibra muscular.

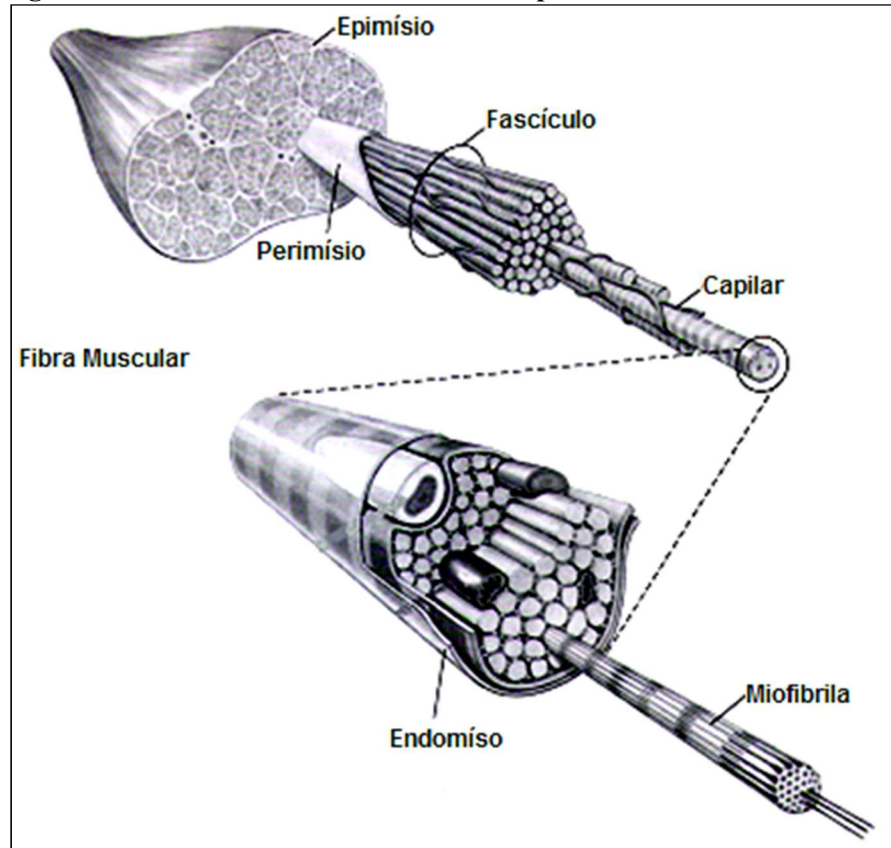
Fonte: Adaptado de Reis Filho (2014)

A fibra muscular é a unidade estrutural do músculo esquelético, com espessura que varia de 10 a 100 micrômetros e comprimento de 10 a 50 centímetros. O músculo é revestido por camadas de tecido conectivo semelhante a outros presentes em outras estruturas do corpo, que propiciam a organização das fibras musculares, em três conjuntos diferentes: *endomísio*, *perimísio* e *epimísio* (NEUMANN, 2006).

O endomísio envolve as fibras musculares individualmente e é composto por um sistema de malhas densas de fibrilas colágenas. O perimísio envolve feixes de fibras formando os fascículos, constituindo canais para os vasos sanguíneos e nervos. O epimísio é um tecido que

contém feixes de fibras colágenas entrelaçadas e envolve toda a superfície do ventre muscular separando-o de outros músculos (FIGURA 2). Circundando todo o epimísio, existe um tecido conectivo denso e resistente que percorre todo o músculo e estende-se para formar o tendão fibroso, cuja função é fixar o músculo ao osso, conhecido com fáscia (NEUMANN, 2006; MESQUITA, 2007).

Figura 2 - Os diferentes tecidos conectivos presentes no músculo



O epimísio envolve o ventre muscular, o perimísio recobre os fascículos. Cada fibra muscular contendo miofibrilas é envolvida pelo endomísio.

Fonte: adaptado de Neumann (2006).

Embora os diferentes tecidos conectivos sejam descritos separadamente, eles estão entrelaçados de tal maneira que podem ser considerados como uma única lâmina contínua de tecido que envolve o músculo, contribuindo para gerar tensão passiva por resistência ao estiramento, ajudando ao músculo a recuperar sua forma após extensão e transferindo força contrátil para o tendão (NEUMANN, 2006).

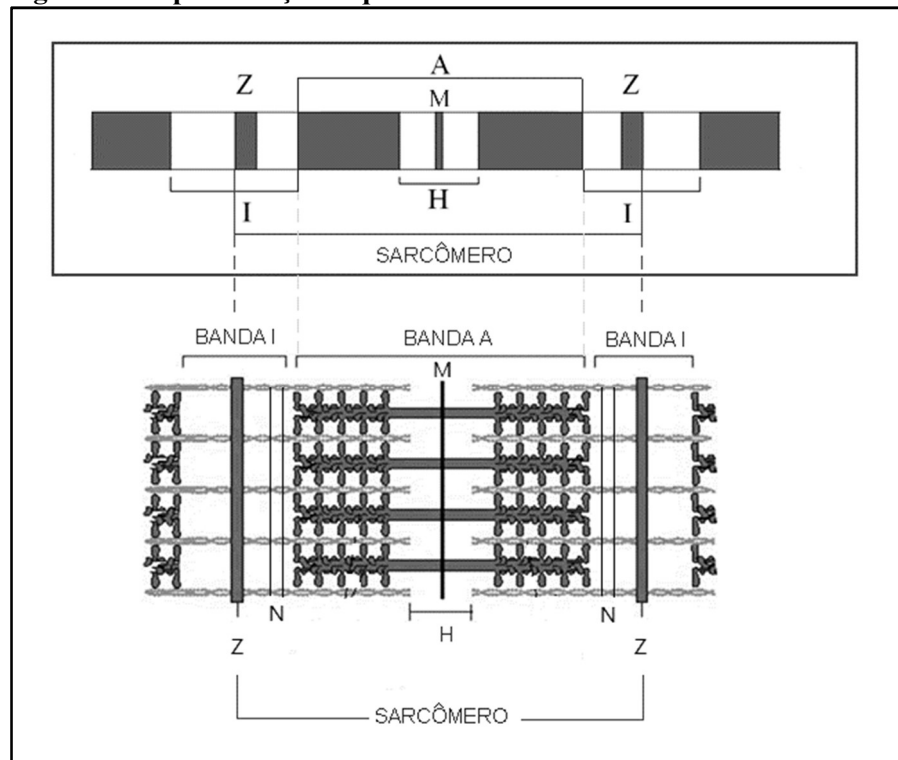
2.2.1 Organização e Microestruturas

Ao tecido muscular é destinada a função exclusiva de geração de força em resposta a um estímulo proveniente do sistema nervoso (NEUMANN, 2006). A força ativa é produzida pela fibra muscular ou célula muscular, que por sua vez é composta por minúsculos filamentos chamados de miofibrilas, sendo estes os elementos contráteis da fibra muscular. Quando observadas ao microscópio óptico, as fibras musculares esqueléticas mostram estriações transversais, resultantes da repetição de unidades iguais chamadas de sarcômeros, a qual é a parte de uma miofibrila. Assim, cada miofibrila representa uma série contínua de sarcômeros unidos (NEUMANN, 2006).

O sarcômero é considerado o gerador de força ativa da fibra muscular e contém dois conjuntos de filamentos proteicos contráteis, um delgado contendo actina e outro espesso contendo miosina. A força é gerada quando os filamentos de actina deslizam, passando pelos filamentos de miosina, causando o encurtamento do sarcômero (HUXLEY e NIEDERGERKE, 1954; HUXLEY e HANSON, 1954; BRUNELLO *et al.*, 2006).

Essa unidade definida como sarcômero (FIGURA 3) vai de uma **banda Z** até outra banda Z (Zwischenschibe, intermediário ou entre os discos). As estriações evidentes no músculo esquelético são devidas à refração diferencial da luz quando ela passa pelas proteínas contráteis e compreende a zona chamada de **banda A** (Anisotrópica) e **banda I** (Isotrópica). Dentro da banda A existe uma zona que contém somente filamentos grossos, isenta de filamentos finos, é conhecida como **banda H** (*Hellerscheibe* ou disco claro). Cada grupo de filamentos (grossos e finos) é preso a uma banda transversa central, os filamentos grossos que se ligam à **banda M** (*Mittelscheibe* ou disco médio) é assim chamado para indicar sua posição no meio do sarcômero. A **zona N** (*Nebenscheibe* ou próximo a) podem ser a região de maior da concentração do cálcio intracelular (HAMILL, 2008).

Figura 3 - Representação esquemática da miofibrila mostrando um sarcômero



Fonte: Elaborada pelo autor

Desde 1963, com os estudos de Huxley, foi fornecida uma visão detalhada das estruturas dos filamentos dos músculos esqueléticos. Esses estudos mostraram que a unidade básica funcional do sarcômero consistia em dois tipos de filamentos proteicos mutuamente paralelos. A actina constitui a parte central dos filamentos finos, encontrados essencialmente em todas as células eucarióticas (CRAWFORD *et al.*, 2002). É um polipeptídeo de cadeia única que é extraordinariamente bem conservada na sequência de aminoácidos em espécies que vão desde organismos unicelulares primitivos até plantas e animais (SHETERLINE e SPARROW, 1994). Esta proteína é essencial para uma enorme variedade de funções celulares, incluindo a divisão celular, migração, junção, formação, remodelação da cromatina, regulação da transcrição, e regulação da forma da célula (PERRIN e ERVASTI, 2010). Composta por diferentes isoformas, a actina apresenta seis diferentes genes nas aves e mamíferos e cada um codifica uma isoforma, sendo quatro destas (α esquelética-actina, α cardíaca-actina, α liso-actina, γ liso-actina) expressas principalmente em músculo esquelético, cardíaco e liso (PERRIN e ERVASTI, 2010).

A actina é um polipeptídeo de cadeia simples com cerca de 43 kDa². Foi identificada pela primeira vez como parte do complexo proteico acto-miosina responsável pela produção da

² Da equivale a uma unidade de massa atômica (u), sendo uma unidade ainda comumente utilizada para expressar massas de átomos, moléculas ou macromoléculas em complexos químicos (1 kDa = 1000 Da).

força contrátil no músculo esquelético, tendo sido uma das suas funções inicialmente reconhecida, por formar nos músculos esqueléticos, os filamentos finos do sarcômero. No músculo esquelético humano, esta proteína é idêntica, em sequência, à actina de músculo de rato, coelho, camundongo, frango e vaca (SHETERLINE e SPARROW, 1994).

A molécula de miosina é uma proteína incomum, porque não pode ser classificada como uma enzima globular ou uma proteína de estrutura fibrosa, pois combina ambas as classes de moléculas em uma unidade funcional, ligadas covalentemente (LOWEY *et al.*, 1969). Em particular, é a proteína mais abundante do músculo, contendo 6 cadeias polipeptídicas: 2 pesadas com peso molecular de 200 kDa (Myosin Heavy Chain ou MHC) e 4 leves cujos pesos moleculares variam de 15 a 27 kDa (Myosin Light Chain ou MLC) enroladas em α -hélice formando um hexâmero (LOWEY *et al.*, 1969; PIOVESAN *et al.*, 2009). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, conhecida como porção globosa da miosina, a qual apresenta o sítio de ligação com a actina e a região capaz de ligar-se à molécula de ATP e hidrolisá-la (atividade ATPásica) (HUXLEY, 1969; LOWEY *et al.*, 1969). As isoformas da miosina, determinadas pela reação histoquímica da ATPase, indicam os tipos de fibras musculares.

2.2.2 Tipologia

Inicialmente, as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (RANVIER, 1873; OGATA, 1958). Posteriormente, por meio de técnicas histoquímicas, observou-se que os músculos estriados dos mamíferos eram constituídos por uma população heterogênea de fibras, que apresentavam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (DUBOWITZ e PEARSE, 1960).

Durante a embriogênese são formados os miotubos primários e secundários simultaneamente, e inervados em diferentes fases do desenvolvimento. Para os miotubos secundários, além de inervação específica, a atividade muscular também é necessária. (ROSS *et al.*, 1987). As fibras primárias tendem a formar fibras lentas, enquanto que as fibras secundárias tendem a formar fibras rápidas (BRAMELD, 2004). De acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina (ATPase miofibrilar ou m-ATPase), três tipos principais de fibras musculares foram descritos, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB (BROOKE e KAISER, 1970). O metabolismo e

consumo de energia variam de acordo com os diferentes tipos de fibra, pois existem diferenças mecânicas nas respostas das fibras musculares em função de cada tipo (HAMILL, 2008).

As fibras do tipo I são encontradas na maioria dos músculos posturais e são consideradas de contração lenta e metabolismo oxidativo. São vermelhas devido ao alto conteúdo de mioglobina, sendo adaptadas para trabalhos prolongados de baixa intensidade (OGATA, 1958; HAMILL, 2008). Delp e Duan (1996) e Staron e colaboradores (1999) ao avaliarem músculos de ratos, constataram que o músculo Sóleo possui predominantemente fibras tipo I. É classificado como postural e possui cerca de 80% de suas fibras musculares de metabolismo oxidativo, usam primordialmente a gordura como substrato energético e sua velocidade de contração é relativamente lenta, sendo resistente à fadiga (GOLLNICK *et al.*, 1974; DA SILVA ARAGAO *et al.*, 2013).

Por outro lado, as fibras do tipo II são subdivididas em IIA, apresentam metabolismo oxidativo-glicolítico, sendo consideradas de contração rápida intermediária e tipo IIB com metabolismo exclusivamente glicolítico, capazes de produzir força rapidamente, entretanto também se fadigam rapidamente, possuem baixo teor de mioglobina (OGATA, 1958; HAMILL, 2008). Portanto, as isoformas da miosina são consideradas os marcadores moleculares do tipo de fibra muscular, as fibras do tipo I, com MHC I, fibras do tipo IIA, com MHC Iia, fibras do tipo IIB, com MHC Iib e fibras do tipo IID com MHC Iid. A MHC Iid está presente nos músculos de pequenos mamíferos e possui uma velocidade de contração intermediária entre as MHC Iia e MHC Iib (TERMIN *et al.*, 1989; HILBER *et al.*, 1999; BOTTINELLI e REGGIANI, 2000).

Baseado em vários tipos de evidências e na análise de sequências de DNA, a MHC Iib identificada em humanos é na verdade homóloga à MHC Iid/Iix presente nas fibras IID/IIX de pequenos mamíferos como ratos, camundongos e coelhos (PETTE e STARON, 1997). Deste modo, os humanos expressam as seguintes isoformas de MHC (de acordo com a velocidade de contração): MHC I, MHC Iia e MHC Iid/Iix (STARON, 1997) e não expressam a mais rápida isoforma de todas, a MHC Iib (HILBER *et al.*, 1999). Em ratos, o músculo EDL têm predomínio de fibras do tipo II, puras e híbridas, sendo 38% do tipo IID, 38% do tipo IIB, 20% do tipo IIA e apenas 4 % de fibras tipo I (DELP e DUAN, 1996; STARON, 1997). Assim, a cadeia pesada de miosina é um dos principais componentes do aparelho contrátil de todos os músculos estriados e o conteúdo de sua isoforma pode explicar a heterogeneidade funcional dos músculos (AGBULUT *et al.*, 2003).

Estudos envolvendo a microdissecção de fibras e associando a reação histoquímica m-

ATPase com a técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida em músculos de ratos, possibilitaram a separação de quatro isoformas de cadeia pesada de miosina presentes nas fibras musculares (TERMIN *et al.*, 1989). O princípio físico-químico que norteia a eletroforese, segue a Lei de Coulomb em que moléculas carregadas migram sob influência de um campo elétrico. A velocidade de migração é proporcional ao campo elétrico e inversamente proporcional ao seu volume molecular (MORAES *et al.*, 2013).

Métodos bastante simples que conseguem a separação por eletroforese de proteínas ou de fragmentos de ácidos nucleicos de amostras de tecidos são os *Blotting*. As técnicas de *Blotting* são utilizadas para identificar e mensurar proteínas únicas ou sequências de ácidos nucleicos de extratos biológicos. Elas foram desenvolvidas para serem altamente específicas e sensíveis e se tornaram ferramentas importantes tanto na bioquímica, biologia molecular quanto em investigação clínica (ALMEIDA *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2013).

As três principais técnicas de *Blotting* são identificadas por *Northern*, *Southern*, e *Western Blotting*, e possibilitam a identificação de RNA, DNA e proteínas, respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2010). A técnica de *Western Blotting* é um tipo de eletroforese convencional em que as proteínas migram em meio de suporte poroso como acetato de celulose, gel de agarose ou de poliacrilamida, gerando um eletroferograma por zonas de proteínas e permite que proteínas específicas sejam identificadas com anticorpos específicos utilizados como sondas analíticas (HEIDEBRECHT *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Devido as altas concentrações, o tecido muscular esquelético torna-se uma fonte de proteína no organismo, sendo também sensível à desnutrição proteica. Portanto, quando há déficit protéico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção ocasionando alterações nas fases de crescimento e diferenciação das fibras musculares (ALVES *et al.*, 2008).

2.2.3 Efeitos da desnutrição sobre o músculo esquelético

A desnutrição ocorre quando alimentos e ingestão de nutrientes são incapazes de satisfazer as necessidades energéticas ao longo do tempo, levando a uma ruptura da homeostase dos tecidos, do peso corporal e da função física (SKIPPER, 2012). A desnutrição tanto pode ser uma consequência como uma causa de doença e apesar dos diversos parâmetros de avaliação nutricional existentes, não há um padrão que dê segurança aos profissionais em sua prática diária (FONTOURA *et al.*, 2006; WATTERSON *et al.*, 2009).

A concentração plasmática das proteínas totais é relatada como um importante e

confiável parâmetro para a avaliação da desnutrição (SANTOS *et al.*, 2004; NWOKOCHA *et al.*, 2012b), embora, clinicamente, a dose isolada de proteína total tenha pouco valor, uma vez que uma mudança em uma das suas frações (globulinas ou albumina) pode ser compensada, alterando a outra (LABTEST, 2014). Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são variados e não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. No entanto, as metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas no ultravioleta e no visível, tendo como os métodos geralmente mais utilizados o do biureto, o de Lowry, o do “Coomassie brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford, o do BCA ou reagente de Smith, e o de absorção de proteínas no ultravioleta (ZAIA *et al.*, 1998).

O método do biureto se baseia na reação de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall e colaboradores (1949). O produto da reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm sendo esta última a mais utilizada para fins analíticos, por sofrer menor interferência de diversas substâncias presentes no meio que absorvem em 270 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

A análise do estado nutricional é um parâmetro que pode ser utilizado para diagnosticar as condições nutricionais do organismo, refletindo na funcionalidade dos diversos sistemas do corpo (MELLO, 2002). Em alguns mamíferos, como o homem, ovelhas, porcos e ratos, o sistema muscular, por exemplo, apresenta períodos em seu desenvolvimento que são particularmente vulneráveis as agressões nutricionais. Desde modo, a desnutrição nestes períodos, pode danificar irreversivelmente a estrutura deste tecido. Durante a gestação pode ocorrer redução na multiplicação celular e consequentemente, diminuição do número das fibras musculares devido à desnutrição (BEDI *et al.*, 1982; PARK *et al.*, 2003; BAYOL *et al.*, 2004). O período gestacional é crítico, pois é nesta fase que ocorre a formação dos miotubos secundários durante a ontogênese e a desnutrição intrauterina parece reduzir o número da subpopulação de células miogênicas, limitando permanentemente o número de miotubos secundários (WILSON *et al.*, 1988).

Particularmente durante o período fetal, a desnutrição pode induzir alterações metabólicas, estruturais e funcionais no músculo esquelético, tais como: diminuição da massa muscular (BEDI *et al.*, 1982; TOSCANO *et al.*, 2006) e aumento da sua capacidade oxidativa (WHITE *et al.*, 2000). Ao nascer, a maturidade das fibras musculares independe do estado nutricional, porém a desnutrição energética afeta o músculo esquelético se ocorrer durante a fase de miogênese, alterando a distribuição do tipo de fibra (ALVES *et al.*, 2008)

Alguns estudos demonstraram em várias espécies de mamífero, que a desnutrição materna durante a gestação pode reduzir significativamente o número das fibras musculares e dos núcleos na descendência (BEDI *et al.*, 1982; WILSON *et al.*, 1988; DWYER *et al.*, 1994; DWYER *et al.*, 1995). No rato, a desnutrição materna durante a gestação produz a mesma redução no número de fibras musculares na prole submetida à desnutrição, durante a gestação e lactação (WILSON *et al.*, 1988). A redução do número de fibras no músculo esquelético fetal devido à restrição de nutrientes maternos, provavelmente resulta em consequências fisiológicas durante a vida pós-natal (ZHU *et al.*, 2004). O número de fibras musculares que constituem um músculo esquelético pode ser influenciado pelo estado de nutrição pré-natal materna, no entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a nutrição materna influencia a miogênese não são claros (WILSON *et al.*, 1988; BAYOL *et al.*, 2004).

Fahey e colaboradores (2005) descreveram, respectivamente, diminuição do número de fibras rápidas e aumento do número de fibras lentas no músculo semitendinoso na descendência de cordeiros com restrição calórica, entretanto outros autores relataram não observar nenhuma mudança na densidade de fibras neste músculo, usando o mesmo modelo animal e insulto nutricional (NORDBY *et al.*, 1987). Da Silva Aragão e colaboradores (2013) observaram alteração na composição do tipo de fibra, no perfil de expressão gênica e nas capacidades enzimáticas do músculo esquelético em ratos adultos (4 meses), nascidos de mães desnutridas com dieta hipoproteica e concluíram que estas alterações são dependentes do músculo e correspondem a um estado de deficiência de energia, resultante da deficiência combinada de oxidação de ácidos graxos e de glicólise.

O músculo esquelético utiliza quantidades significativas de ácidos graxos para energia e contém reservas significativas de triglicérides. Por conseguinte, é possível que as alterações nos números e / ou tipos de fibras presentes em um músculo esquelético podem contribuir para o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (resistência à insulina) e / ou obesidade (excesso de tecido adiposo) na vida adulta (BRAMELD, 2004). Há uma variedade de estudos que associam tanto a resistência à insulina ou a obesidade com as características do metabolismo do músculo esquelético, bem como ligando desnutrição materna durante estágios críticos de desenvolvimento muscular com quantidade e tipos de fibras musculares formadas (BRAMELD, 2004).

O músculo esquelético é conhecido por ser uma grande reserva de proteína, em seu estado normal é constantemente submetido a síntese ou degradação dessas macromoléculas. Quando submetido a desnutrição a taxa deste metabolismo é prejudicada e alterações

morfológicas são induzidas. Oumi e colaboradores (2000,2001) observaram em músculos de ratos desnutridos, com dieta a 5% de caseína, por meio de microscopia eletrônica, mudanças ultraestruturais em alguns sarcômeros das miofibrilas, em que as linhas Z foram interrompidas e os sarcômeros apresentaram-se com aparência irregular.

Em relação as propriedades contráteis, Prakash e colaboradores (1993) verificaram uma diminuição da força nas fibras do músculo diafragma em rato desnutrido durante a gestação. Enquanto que Wareham e colaboradores (1982) encontraram um aumento na força tetânica relativa desenvolvida pelo Sóleo e pelo Extensor Longo dos Dedos (EDL) de ratos aos 12 meses, desnutridos durante o período gestacional e de lactação.

Bedi e colaboradores (1982) observaram em ratos aos 180 dias de vida, que a desnutrição durante a gestação e aleitamento não modificou as proporções dos diferentes tipos de fibras no musculo Sóleo, porém no musculo EDL, isto não aconteceu, sendo constatado um aumento do número de fibras tipo I e tipo IIa e diminuição das fibras IIb. O tipo de fibra, a morfologia, a capacidade oxidativa e resposta à sobrecarga do músculo podem ser influenciados por muitos fatores, tais como: fornecimento de nutrientes, sua atividade contrátil e a exposição à radiação ionizante (BULLER *et al.*, 1960; BAYOL *et al.*, 2004; JURDANA *et al.*, 2013).

2.2.4 Efeitos da Radiação Ionizante sobre o Músculo Esquelético

A musculatura esquelética adulta é altamente resistente à radiação ionizante, a menos que doses mais elevadas, na ordem de 5Gy, sejam aplicadas. Isto é atribuído ao baixo número de células radiossensíveis em proliferação, nesta fase da vida. No entanto, o músculo esquelético em desenvolvimento é sensível à radiação ionizante, assim, a radioterapia na infância pode induzir atrofia muscular (JURDANA, 2008).

Pouco se sabe a respeito dos efeitos específicos da radiação ionizante sobre a musculatura esquelética, considerando os efeitos imediatos e tardios e a relação dose-resposta. Entretanto, alguns estudos investigaram esses efeitos, os quais poderiam ser classificados em quatro grupos distintos: **i)** alterações no metabolismo celular; **ii)** repercussões sobre células satélites; **iii)** formação de fibrose e atrofia muscular; **iv)** regeneração do tecido (VIANA *et al.*, 2015).

2.2.4.1 Alterações no Metabolismo Celular

Gerstner e colaboradores (1953) estudaram comparativamente os efeitos da radiação em músculos de coelhos (animais de sangue quente) e músculos isolados de rãs (animais de sangue frio) submetidos a taxas de dose intensas de raio-X. Os músculos de rã com doses acima de 870 Gy fadigaram rapidamente, apresentando contratura, prolongado tempo de relaxamento, diminuição da amplitude de contração para cargas pesadas (50g) e alterações histológicas 8 horas após a exposição. Por sua vez, músculos de coelhos expostos proporcionalmente à radiação de 626,4 Gy exibiram uma progressiva e gradual deficiência da função com completa incapacidade funcional dentro de 24 horas após a irradiação, acompanhada por alterações histológicas graves. Esses autores concluíram que, enquanto o músculo permanece em condições de repouso ou de baixa atividade, estágios iniciais de danos provocados pela radiação permanecem latentes, tornando-se rapidamente evidentes quando um alto desempenho é exigido, sendo o metabolismo muscular atacado primeiramente, enquanto que altas intensidades de radiação afetaram os músculos isolados de rãs quase imediatamente.

Em outra pesquisa também em coelhos, irradiados com 9,83 Gy e 11,3 Gy Khan e colaboradores (1974) observaram aumento local do conteúdo de glicogênio muscular das fibras intactas, sendo que lesões na fibra muscular e na micro vasculatura também foram identificadas logo nas primeiras 24 horas após a irradiação. Essa repercussão foi vista ainda até o 40º dia após a irradiação.

Ahlersová e colaboradores (1981) usaram em seu estudo, ratos da linhagem Wistar irradiados com uma dose de corpo inteiro de 2,39 Gy de raios X em jejum na noite anterior da irradiação, constatando alterações no metabolismo de carboidratos e redução do glicogênio muscular 6 horas após a irradiação, com posterior aumento ao 3º e 14º dia. A cinética de alterações do glicogênio produzidas pelo jejum no músculo esquelético e cardíaco foi semelhante às alterações provocadas pela irradiação, em especial durante a primeira semana.

Degradação das proteínas titina e nebulina com diminuição das propriedades elásticas do músculo, foi observada por Horowitz e colaboradores (1986) em estudo em coelhos isolando o músculo psoas, e irradiados com 15.000 Gy. A capacidade das células musculares de gerar tensão passiva e ativa foi reduzida devido ao desalinhamento axial dos filamentos grossos que aparentemente são mantidos centralizados no sarcômero pela titina e/ou nebulina.

Schwenen e colaboradores (1989) verificaram que após exposição local de patas posteriores de ratos a 15 Gy de radiação gama, ocorreu aumento na liberação de aminoácidos,

principalmente alanina, glutamina e outros não metabolizados pelo músculo, e afirmam que estes resultados favorecem fortemente a hipótese de que o aumento da disponibilidade de aminoácidos resulta da degradação aumentada de proteínas no músculo esquelético, com início logo após a irradiação. Esta perturbação induzida pela radiação no metabolismo das proteínas pode ser um dos fatores patogênicos na etiologia da miopatia da radiação.

Voïtsitskiï e colaboradores (1990) constataram alterações na membrana do retículo sarcoplasmático devido à mudanças enzimáticas da Ca^{2+} -ATPase em músculos de patas traseiras de coelhos irradiados com dose de 0,21C/kg (7,30 Gy). Em estudos posteriores, Khizhniak e colaboradores (1990; 1991) também observaram alterações na membrana do retículo sarcoplasmático devido à enzima Ca^{2+} -ATPase. Os autores discutiram que a diminuição na concentração da Ca^{2+} -ATPase foi causada por uma mudança no microambiente enzimático danificando as interações proteína-lípido, essenciais para a atividade funcional desta enzima e alterações na conformação molecular da Ca^{2+} -ATPase contribuem para modificação estrutural da membrana.

Um estudo feito para medir o teor de tiamina dos músculos esqueléticos, fígados de porco e de frango e carne bovina, após irradiação gama oriunda de uma fonte de Césio com doses de 1,5, 3, 6 e 10 kGy a 2° C, foi realizado por Fox e colaboradores (1993), que observaram uma diminuição da tiamina no músculo esquelético três vezes maior, comparando com o fígado. O teor de tiamina no músculo foi outro aspecto afetado pela irradiação gama.

O estudo da Shtifman e colaboradores (2013) procuraram investigar os efeitos de baixa dose de radiação de prótons de alta energia, em uma única aplicação de corpo inteiro, como um modelo para eventos de partículas solares e baixa dose de alta carga de energia de irradiação, como um modelo para raios cósmicos galácticos, sobre a fisiologia do músculo esquelético em camundongos adultos C57BL / 6N WT. Os dados indicam que a irradiação de prótons e partícula de ^{56}Fe resultaram em alterações de cálcio intramiofibrilar.

2.2.4.2 Repercussões sobre a atividade das Células Satélites

Rosenblatt e Parry (1993) hipotetizaram que a hipertrofia muscular compensatória do EDL, produzido pela incapacidade do músculo tibial anterior, seria impedida se, antes de ser sobrecarregado, o músculo EDL fosse submetido à radiação ionizante. Para isso, os membros posteriores direito de ratos foram irradiados com uma dose única Gama de 25 Gy e os músculos tibial anterior foram excisados e descartados. Os resultados apoiaram claramente esta hipótese.

Phelan e colaboradores (1997) irradiaram ratos Wistar machos com uma fonte de Césio-137 com dose de 30 Gy, e observaram que a irradiação impediu a hipertrofia compensatória e formação de fibras musculares, no entanto, não ocorreu diminuição da percentagem de fibras maduras, concluindo que a irradiação prejudica a proliferação das células satélites e seu papel no processo de hipertrofia muscular.

Uma redução no número de células satélite foi constatada por Caiozzo e colaboradores (2010) em um estudo, onde ratas fêmeas da espécie Sprague-Dawley foram irradiadas com radiação gama. Esta redução dependeu da dose aplicada, 2 ou 5 Gy, diminuindo em cerca de 50 e 70%, respectivamente, o número de células. Segundo estes autores, doses clinicamente relevantes de radiação gama produzem elevações significativas no estresse oxidativo, reduzindo acentuadamente os níveis de óxido nítrico (NO) em células satélite e podem provocar um mecanismo de inibição de proliferação *in vitro*.

Ainda investigando os efeitos da radiação sobre os níveis de NO em células satélites, Cho-Lim e colaboradores (2011) utilizaram Nitroprussiato de sódio (SNP) e estiramentos mecânicos em células de músculos retiradas das patas traseiras de ratos machos da espécie Sprague-Dawley, irradiados com doses de 1,2 e 5 Gy de uma fonte gama de Césio 137. Estes procedimentos foram capazes de resgatar a proliferação de células satélites irradiadas devido a aumentos significativos dos níveis de NO, entretanto os alongamentos mecânicos produziram aumentos dos níveis de NO mais eficazes do que o SNP concluindo que elevando-se o nível de NO em células satélites irradiadas resgata-se efetivamente sua proliferação.

McDonald e colaboradores (2014) compararam as propriedades das células precursoras miogênicas entre músculos extraoculares e das patas traseiras de camundongos C57BL / 10 e distróficos mdx. E afirmaram que a radiação perturba o processo normal de remodelação dos músculos extraoculares, que reagem, paradoxalmente, produzindo um aumento de células precursoras miogênicas, sugerindo que estes músculos contêm células precursoras resistentes a 18 Gy de irradiação gama.

2.2.4.3 Formação de Fibrose e Atrofia Muscular

Após irradiação gama aguda em suínos, simulando acidente, Lefaix e colaboradores (1990) verificaram através de análises bioquímicas no primeiro mês após a irradiação, uma forte reação inflamatória que provocou a formação de fibrose induzida. Constatou-se que a fibrose muscular resultante era caracterizada por uma alta densidade de miofibroblastos e por

uma distribuição padrão inflamatória de colágeno tipo I, III, IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio. Em outro estudo também em suínos, com irradiação sobre a pele e dirigida para porção posterior e externa da coxa com doses variando entre 16 a 256 Gy de radiação gama, Lefaix e colaboradores (1993) observaram descamação úmida da pele e formação de fibrose nos músculos irradiados após 30 semanas.

Ibarrola e colaboradores (1996), ao contrário dos anteriores, realizaram uma avaliação de efeitos mais tardios. Estes autores acompanharam a progressão das lesões induzidas pela irradiação por um período de 12 meses em músculos da região ilíaca de coelho, irradiado com gama na superfície da pele em doses de 40 e 80 Gy. Por meio de ressonância magnética, foram detectadas lesões após 22 semanas no grupo irradiado com 40 Gy e, mais precocemente, em 17 semanas para o grupo com 80 Gy. Os resultados sugerem que a atrofia do músculo e a extensão da lesão aumentaram em função da dose na superfície da pele.

Uma abordagem clínica representada pelo estudo de van Leeuwen-Segarceanu e colaboradores (2012) realizado em 12 pacientes com linfoma de Hodgkin, tratados com radioterapia entre 1969 e 1998, descreveu os danos aos músculos e propôs um mecanismo fisiopatológico para a fraqueza e atrofia muscular. Dez pacientes (83%) apresentaram queixas no pescoço, principalmente dor e fraqueza muscular. Ao exame clínico, os músculos flexores do pescoço foram os mais afetados comparados aos extensores. Foi observado por meio da ultrassonografia que o esternocleidomastóideo foi severamente atrofiado em oito pacientes.

2.2.4.4 Regeneração do Tecido

Popova e colaboradores (1978) aplicaram Laser, com comprimento de onda de 6328 Å por 10 dias, em músculos de ratos, removidos e irradiados, com uma dose de 8,7Gy de raios-X e em seguida enxertados. O Laser foi capaz de estimular a regeneração das partes lesionadas do músculo. A regeneração não só ocorreu na periferia, como também no interior do músculo e resultou na recuperação da capacidade de contração.

Em outro estudo, Popova e colaboradores (1988) verificaram redução do efeito pós-traumático da radiação, em músculos gastrôcnêmios de ratos, irradiado com doses de 20 a 30 Gy de raios-X, por meio de autotransplante de uma massa viscosa, composta por pedaços de fibras musculares aplicados na extremidade do músculo, que promoveu a formação de fibras musculares diferenciadas e a restauração da capacidade regenerativa.

A descrição de um efeito dose-dependente na inibição da regeneração muscular devido

à irradiação foi feita por Gulati (1987). Músculos extensores longos dos dedos de ratos foram removidos e irradiados a uma taxa de 6,52 Gy/min, e em seguida transplantados ao seu local de origem. Após o transplante, doses de 5,65 Gy, 17,4 Gy e 87 Gy foram administradas, um padrão semelhante de regeneração foi observado nos músculos não irradiados e irradiados com dose de 5,65Gy de raios-X onde a maioria das miofibras sofreu degeneração seguida de regeneração a partir das células satélites precursoras, que se proliferaram, diferenciaram-se em mioblastos e fundiram-se para formar miotubos e miofibras, porém em músculos expostos a 17,4 Gy e 87 Gy as células satélites mantiveram-se indiferenciadas e não se fundiram para formar miotubos.

A fim de observar os efeitos da radiação sobre músculos distróficos de ratos mdx com a idade de 16-20 dias, Granata e colaboradores (1998) irradiaram o músculo Sóleo com dose gama única de 30 Gy. Aos 45, 75 e 90 dias de idade, as seções transversas do ventre muscular foram usadas para o exame microscópico, e constataram que a irradiação parece reduzir a regeneração e crescimento das fibras musculares.

Wernig e colaboradores (2000) implantaram mioblastos cultivados no músculo Sóleo de ratas, previamente irradiado com 16 Gy de raios-X, e constataram que a radiação aumentou a eficácia dos mioblato transplantados, promovendo a proliferação de numerosas fibras, todavia de pequenos diâmetros.

Também são encontrados estudos que tratam de outros efeitos sobre o músculo esquelético. Olivié e colaboradores (1995) observaram que a irradiação gama no músculo em desenvolvimento provoca morte celular por apoptose. Bandstra e colaboradores (2009) afirmam que a radiação altera a distribuição de miofibras, pois constataram no músculo irradiado um número menor de fibras de pequeno calibre, e um aumento de 2,9 vezes na proporção de miofibras centralmente nucleadas sem, no entanto, esclarecer os mecanismos destas mudanças.

A integridade estrutural da membrana plasmática foi afetada pela irradiação com feixes de íons pesados, tendo sido observada a ocorrência de saliências irregulares na membrana plasmática (invaginações) e rompimento dos sarcômeros, no estudo de Hino e colaboradores (2009), concluindo que a proteína Disferlina é responsável pela fusão da membrana plasmática e a insuficiência desta provoca defeitos em sua superfície.

Lesões musculares nas patas traseiras de ratos Wistar machos após exposição a altas doses de radiação foi avaliada por Hsu e colaboradores (1998) por meio de biópsia, ambas as patas foram expostas a raios X em 40 doses de 2 Gy, totalizando uma dose de 80 Gy. O músculo gastrocnêmio irradiado exibiu alterações morfológicas progressivas, que começaram imediatamente após a conclusão das exposições, caracterizadas por hemorragia, infiltração

linfocítica e destruição vascular. Até 12 meses após a exposição final, nenhuma recuperação do tecido muscular foi observada.

Estudo recente (RUSSELL e CONNOR, 2014) investigou o efeito da radiação sobre os músculos da língua associada com o envelhecimento, para determinar se o envelhecimento altera a extensão da lesão causada por radiação. No referido estudo, trinta e sete ratos machos Fisher 344 / Brown Norway foram irradiados com uma dose de 22 Gy ao longo de dois dias equivalentes a uma única fração de 16 Gy, correspondente a dose biológica a 103 Gy. A radiação foi associada com uma diminuição significativa na produção de força e velocidade de contração reduzida do músculo da língua. No entanto, o tratamento com radiação não levou à atrofia muscular e a formação de fibrose nos músculos da língua e não foram observadas alterações atróficas exacerbadas com o envelhecimento.

Os estudos acima citados não tratam dos efeitos da radiação sobre o músculo esquelético humano, pois pesquisas que impliquem na exposição de seres humanos às radiações ionizantes seguem rigorosamente normas de segurança radiológica. Deste modo o modelo animal surge como uma alternativa para pesquisas desta natureza.

2.3 O Modelo Animal

Em 1865, Claude Bernard, em seus estudos de fisiologia lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Seu trabalho intitulado “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” estabeleceu regras e princípios para o estudo experimental em medicina. Ele provocou situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes à de doenças em humanos (BERNARD, 1965; FAGUNDES e TAHA, 2004). Os ratos albinos tornaram-se os animais experimentais mais comumente usados em pesquisas biomédicas, sendo reconhecidos como modelo preeminente dos mamíferos (SENGUPTA, 2013).

Um modelo é uma imitação e deve apresentar características suficientes para se assemelhar ao objeto imitado, com capacidade de ser manipulado sem as limitações da população alvo. Deve também atender aos pressupostos de que o fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos (FAGUNDES e TAHA, 2004).

O uso de modelos de experimentação animal tem contribuído enormemente para o entendimento de muitos estudos em humanos referentes à genética, às doenças e às interações medicamentosas de diversos fármacos. Os ratos são os animais mais utilizados nesses estudos,

correspondendo a aproximadamente 20% do número total de mamíferos utilizados para fins científicos, especialmente para estudos *in vivo* (BENTO-SANTOS *et al.*, 2012; SENGUPTA, 2013).

O entendimento dos fatores etiológicos, mecanismos e tratamento de enfermidades, usando outras espécies animais como modelos, trouxe também a difícil tarefa de extrapolação dos resultados destes modelos para os seres humanos (FAGUNDES e TAHA, 2004). Neste contexto, e utilizando modelo animal, infere-se que a radiação ionizante e a desnutrição conjugadas devem ser responsáveis por efeitos deletérios a longo prazo no músculo esquelético, com repercussões negativas à saúde em cenários tais como aqueles associados a tratamento envolvendo TBI.

Neste contexto, esta pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos a longo prazo da radiação ionizante sobre as proteínas contráteis dos músculos Sóleo e EDL em ratos submetidos ou não à desnutrição precoce, a fim de confirmar a hipótese de que a TBI e a desnutrição agem negativamente sobre as proteínas contráteis musculares reduzindo a quantidade de suas expressões.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da pesquisa

Esta pesquisa foi idealizada dentro de um delineamento longitudinal, de natureza descritiva e abordagem quantitativa. Os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), os quais estão de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, sob o processo N° 23076.021454/2013-69.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Pernambuco, no Departamento de Nutrição, juntamente com o Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada – LAMBDA,

do Departamento de Energia Nuclear, o Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT/ NUPIT – UFPE e o Laboratório de Educação Física do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE.

3.3 Grupos experimentais e dietas

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar (BENTO-SANTOS *et al.*, 2012), os quais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclos constantes de luz (6:00 às 18:00 h) e escuridão (18:00 às 6:00 h). Ratas virgens, com idade de 120 dias, foram selecionadas e, em seguida, colocadas para acasalar (2 fêmeas/1 macho). Foi designado como dia da concepção (dia 1 de gravidez) aquele em que foram observados espermatozóides por meio do esfregaço vaginal.

As ratas grávidas foram transferidas para gaiolas individuais de maternidade, onde receberam água filtrada e dieta controle normoproteica (17% de proteína) de acordo com as recomendações da AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) ou uma dieta hipoproteica e isocalórica (8% de proteína) durante toda a gestação e lactação (21 dias pós-natal), em regime *ad libitum*.

A composição da dieta de baixa proteína isocalórica purificada (8% de proteína), utilizada neste trabalho, foi formulada a partir de AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) e recomendada pelo Instituto Americano de Nutrição em estudos que visam reproduzir, em roedores, as mesmas condições de alterações metabólicas que resultam na desnutrição proteica.

Várias pesquisas têm adotado esta dieta de baixo teor proteico para induzir desnutrição em ratos e, conforme estabelecido pela International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM), o levantamento da desnutrição é acompanhado pela avaliação do ganho de massa corporal (LATORRACA *et al.*, 1998; NEIVA *et al.*, 1999; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; FALCÃO-TEBAS *et al.*, 2012; DE SANTANA MUNIZ *et al.*, 2013; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014; ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2015; FERRO CAVALCANTE *et al.*, 2016). Outro critério adotado também pela ISRNM como parâmetro bioquímico é a avaliação da concentração de albumina sérica (VEGINE *et al.*, 2011).

Os ingredientes utilizados para a preparação das dietas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composições das dietas experimentais

Ingredientes	Dieta controle (17% de proteína)	Dieta hipoproteica (8% de proteína)
	g/kg	g/kg
Caseína (84%)	202,40	95,23
Amido de milho	527,026	634,256
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	77,0	77,0
Fibras	50,0	50,0
Mix Vitamínico ¹	10,0	10,0
Mix Mineral ²	35,0	35,0
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
L-metionina	3,0	3,0
Butil-hidroxi-tolueno (BHT)	0,014	0,014
TOTAL	1006,94	1007,00

Valores obtidos a partir da AIN-93G, Reeves et al, 1993.

1- Mistura de vitaminas fornecidas (mg / kg de dieta): ácido nicotínico 30,0, pantotenato de cálcio 16,0, piridoxina-HCl 7,0, tiamina-HCl 6,0, riboflavina 6,0, ácido fólico 2,0, biotina 2,0, cianocobalamina 25,0, α - tocoferol 150,0, palmitato de retinol 8,0, colecalciferol 2,5, e filoquinona 0,75.

2- Mistura de minerais fornecidos (mg / kg dieta): cálcio 5,0, fósforo 1,6, sódio 1,0, potássio 2,3, magnésio 0,5, ferro 0,03, zinco 0,03, e cobre 0,01.

Após 24 horas do nascimento, as ninhadas foram limitadas a oito filhotes para cada mãe. Ao desmame, as ratas-mães e as suas filhas foram sacrificadas, enquanto que os filhotes machos passaram a receber a dieta normoproteica padrão do biotério (Presence® Ratos e Camundongos), também em regime *ad libitum*. Para constituir os grupos experimentais garantindo a heterogeneidade, os animais foram randomizados e cada grupo foi constituído por 9 animais cada, oriundos de pais diferentes de pelo menos três ninhadas distintas, da seguinte forma:

Grupo Normonutrido (N): alimentados com dieta a 17% de proteína durante as fases de gestação e lactação (dieta oferecida às ratas gestantes-lactantes). Após desmame, os animais receberam dieta padrão para roedores.

Grupo Desnutrido (D): alimentados com dieta a 8% de proteína durante as fases de gestação e lactação (dieta oferecida às ratas gestantes-lactantes). Após desmame, os animais receberam dieta padrão para roedores.

Grupo Normonutrido-irradiado (NI): alimentados com dieta a 17% de proteína durante as fases de gestação e lactação (dieta oferecida às ratas gestantes-lactantes). Após desmame, os

animais receberam dieta padrão para roedores e foram submetidos a irradiação de corpo inteiro.

Grupo Desnutrido-irradiados (DI): alimentados com dieta a 8% de proteína durante as fases de gestação e lactação (dieta oferecida às ratas gestantes-lactantes). Após desmame, os animais receberam dieta padrão para roedores e foram submetidos a irradiação de corpo inteiro.

A cada 10 dias, sempre no período da manhã, foram registrados os valores referentes à massa corporal de cada animal até completarem 90 dias de idade. Os animais foram pesados em uma balança (Filizola modelo MF 3/1) com capacidade de 3 kg e erro de 0,5g.

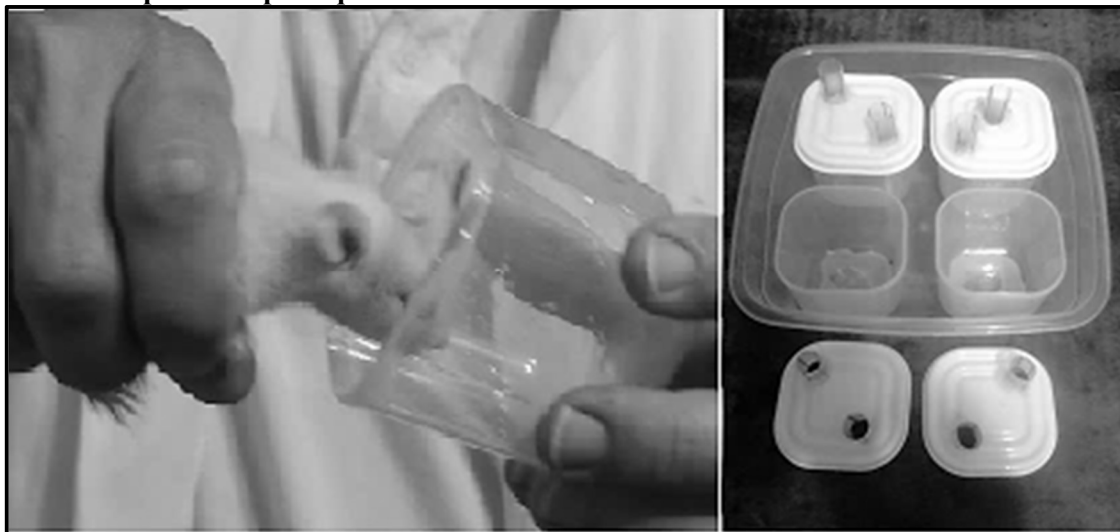
Aos 90 dias de idade, os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo o sangue coletado imediatamente em tubos de ensaio, para posteriormente serem submetidos a centrifugação a 1370 força-G (3500 rpm), 4°C, por 20 minutos. Em seguida foram removidos os músculos Sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) e congelados imediatamente em dióxido de carbono (CO₂) em estado sólido e armazenados a -80°C até serem processados. Estes procedimentos ocorreram no início da noite.

O soro sanguíneo sobrenadante foi separado e colocado em microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 ml e congelados a -80°C para análise posterior.

3.4 Irradiação

Com idade de 28 dias, os ratos dos grupos NI e DI foram submetidos à irradiação gama de corpo inteiro, na dose de 2,5 Gy, em uma fonte de cobalto-60 (por meio de um irradiador Theratron 780 (AECL/Best Medical)), com energia de 1,25 MeV a uma taxa de dose de 75 cGy/min em uma única seção, pertencente ao Centro de Radioterapia de Pernambuco – Hospital de Câncer de Pernambuco (CERAPE/HCP). Durante a irradiação, os animais foram contidos com auxílio de um dispositivo composto por um conjunto de recipientes plásticos, desenvolvido especificamente reduzir a mobilidade, cujas dimensões externas em centímetros (17,0 x 17,0 x 6,5) foram estabelecidas tomando-se como base o tamanho e volume de um fígado humano adulto e com capacidade para acomodar quatro ratos, pesando aproximadamente 50g ou 80g que correspondem, respectivamente, ao peso médio de um animal desnutrido ou eutrófico (FIGURA 4). A irradiação teve duração aproximada de 3 minutos, sendo assegurada suficiente oxigenação. Para garantir a uniformidade da radiação, o recipiente externo foi preenchido com água. Os animais pertencentes aos grupos N e D não receberam irradiação, porém foram submetidos as mesmas condições dos outros grupos.

Figura 4 - Dispositivo utilizado para irradiação de ratos com 80 g de massa corporal e capacidade para quatro animais.



Fonte: Elaborada pelo autor

3.5 Quantificação de Proteínas Totais e Albumina no soro sanguíneo

O método do Biureto (método padrão para proteínas totais) tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios e não apresenta grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas. Apesar de apresentar algumas desvantagens quando comparado com outros métodos, o método de Biureto continua sendo recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sanguíneo pela Associação Americana de Análises Clínicas e por diversos autores (ZAIA *et al.*, 1998; ZAIA *et al.*, 2005).

A quantificação das proteínas totais presentes no soro sanguíneo utilizando o método do Biureto foi de acordo com o protocolo de teste da LABTEST (Brasil), referência 99/250, lote (3004) e linearidade entre 1,0 e 14,0 g/dL (LABTEST, 2014), mantendo-se as proporções para uso em placa de cultura em poliestireno de 96 poços com fundo chato. As leituras da banda de absorção com comprimento de onda de 545 nm para cada amostra de cada animal (em triplicata) foram efetuadas por meio de um espectrofotômetro (Fluostar Omega/BMG Labtech, Alemanha). Para a determinação do valor da concentração proteica de cada animal, em gramas por decilitros, utilizou-se a média aritmética dos dois valores mais próximos dentre os três obtidos (VIANA *et al.*, 2016).

A Albumina também foi quantificada por colorimetria (verde de bromocresol). O verde de bromocresol possui especificidade para albumina e não sofre interferência de valores elevados de bilirrubina e hemoglobina, permitindo também que as interferências de valores

elevados de triglicérides sejam corrigidas utilizando o branco de amostra. A quantificação foi em conformidade com o protocolo de teste da LABTEST (Brasil), referência 19/250, lote (4004) e linearidade até 6,0 g/dL (LABTEST, 2014). Foram mantidas as proporções para uso em placa de cultura em poliestireno de 96 poços com fundo chato. As leituras da banda de absorção com comprimento de onda de 630 nm, também em triplicata para cada amostra de cada animal, foram efetuadas utilizando-se o mesmo espectrofotômetro. A média aritmética dos dois valores mais próximos, dentre os três obtidos, também foi usada para determinação da concentração de albumina para cada animal, em gramas por decilitros (VIANA *et al.*, 2016).

3.6 Quantificação das expressões das proteínas contráteis musculares

Um importante método de análise utilizado, para imunodeteção de proteínas, após a separação por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, trata-se do *Western blotting*. Esta técnica é largamente utilizada, pois é capaz de separar todos os tipos de proteínas, mesmo aquelas que são normalmente insolúveis em água e transferi-las para uma membrana adsorvente. Esta técnica é frequentemente utilizada para quantificação dos níveis de proteína que exigem a digitalização de filmes radiográficos e análise subsequente dos valores de cinza das bandas nas imagens resultantes e apresentados posteriormente em forma de gráficos (YATES e GREASER, 1983; GASSMANN *et al.*, 2009; MIGUEL *et al.*, 2012)

A técnica de *Western blotting* apresenta alta especificidade e sensibilidade, sendo esta referida como "padrão ouro" para a detecção de proteínas. Entretanto, por se tratar de uma técnica com várias etapas de execução, o que a torna laboriosa, sua aplicação prática tem sido dificultada principalmente quando se emprega um grande número de amostras. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos trabalhos de pesquisas científicas, em detrimento de outras metodologias que são mais rápidas e de fácil execução (DA CUNHA VASCONCELOS, 2004).

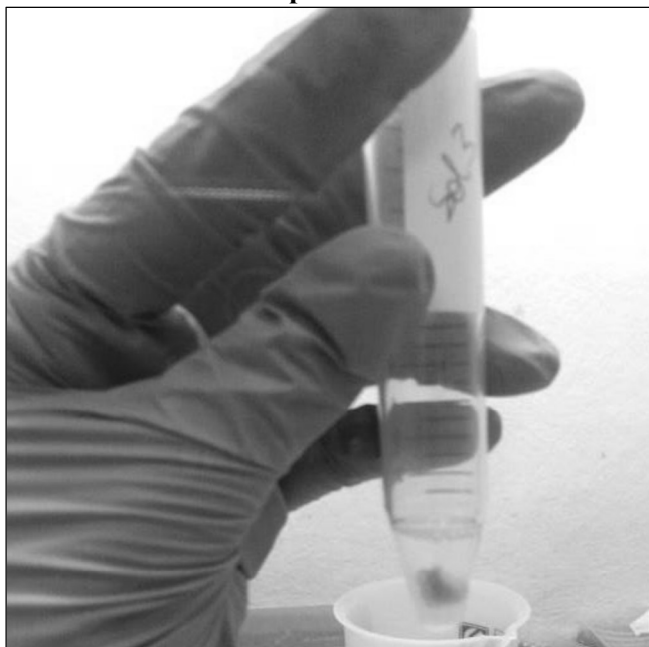
Os passos de elaboração para a técnica podem ser resumidos em cinco etapas: (1) extração e quantificação das proteínas; (2) fracionamento das proteínas da amostra em meio poroso; (3) transferências dessas proteínas para uma membrana; (4) incubação da membrana com um anticorpo para detectar a proteína específica de interesse; e (5) revelação da membrana em filme radiográfico para análise dos dados (HEIDEBRECHT *et al.*, 2009).

3.6.1 Extração das proteínas

Uma solução composta por 800 μ l de tampão de lise citoplasmática (Tris 50mM pH 7,5; NaCl 150mM; Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 5mM pH 8,0; 1% Triton X-100) e 8 μ l de coquetel inibidor de protease (GE Healthcare) foi preparada em tubos de 15 ml com o objetivo de ajudar na trituração e dissolução do tecido, esta solução age na ruptura da membrana citoplasmática e inibe as enzimas responsáveis pela degradação proteica, respectivamente.

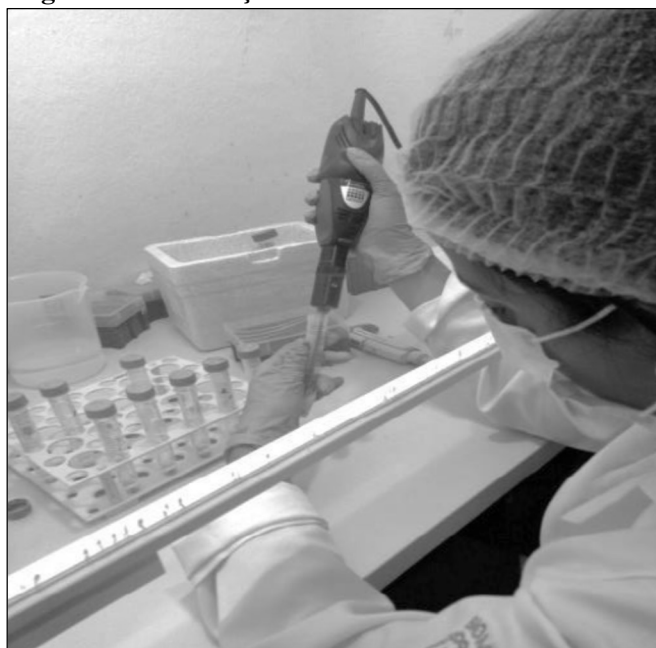
Logo após, as amostras dos músculos descongeladas foram adicionadas à solução (FIGURA 5) e com a ajuda de um triturador, foram trituradas até que todo o tecido estivesse totalmente dissolvido na solução (FIGURA 6). Após a trituração, todo o homogenato foi retirado e colocado em microtubos de 1,5 μ l e submetidos ao processo de mistura e descanso em gelo por 5 minutos. Este processo de mistura e descanso no gelo foi repetido por 3 vezes e em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15.115 força-G (13.000 rpm) a 4° C.

Figura 5 - Amostra de tecido muscular em tubo de 15 ml com tampão de lise citoplasmática e inibidor de protease.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 6 - Trituração do tecido muscular



Fonte: Elaborada pelo autor

Logo após, todo o sobrenadante foi recuperado, e as proteínas contidas no extrato foram quantificadas por colorimetria. Para quantificação foi utilizado ensaio de ácido bicinonínico (BCA), também conhecido como ensaio a base de cobre, conforme kit da Thermo Scientific™ Pierce™ BCA™ Protein Assay Reagent Kit. O uso do método BCA é indicado por ser um dos testes mais sensíveis para detectar concentrações de proteínas menores que 5 µg/ml.

As leituras da banda de absorção em 570 nm para cada amostra de tecido (em triplicata) foram efetuadas por meio de um espectrofotômetro (BioTek EL808 -USA).

3.6.2 Fracionamento das proteínas, incubação e revelação das membranas

Os extratos proteicos foram desnaturados a 95°C por 5 minutos com tampão de Laemmli 6X (7,5 % Tris 2M pH 6,8; 0,5 % Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); 5 % Azul de Bromofenol; 26 % Glicerol; 16,5 % de 2-mercaptoetanol). Em seguida, amostras do extrato (200µg) contendo as proteínas foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % (H₂O; Tris base 1,5M pH (8.8); SDS cf: 0,4 v/v; 30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida; amônio persulfato 10%; Temed) com 1,5 mm de espessura em tampão de corrida Tris-Glicina (3,0 g/l Tris-Base 250mM; 14,5 g/l Glicina, 0,1 % de SDS).

A separação das proteínas foi realizada a 70 V durante 60 minutos e posteriormente a 100 V por aproximadamente 2,5 horas. Após este período, as proteínas foram transferidas para

membranas de PVDF (AmershamHybond-P PVDF Membrane) por 80 minutos a 100 V, utilizando-se o procedimento de transferência úmida. As membranas foram bloqueadas em solução de 5 % de leite desnatado em TBS-T (Tris-Base 1 M pH (6,8); NaCl 5M; 0,1 % de Tween-20 -MP Biomedicals, Ohio, EUA), sob agitação, por 16 horas em temperatura ambiente.

A incubação com os anticorpos primários diluídos em solução de TBS-T e albumina a 3% foi feita durante 6 horas a temperatura ambiente separadamente para cada proteína específica. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários (TABELA 2): monoclonal mouse antidyostelium (224-236-1); monoclonal mouse antibovine (BA-D5); monoclonal mouse antibovine (SC-71); monoclonal mouse antibovine (BF-F3) obtidos de Developmental Studies Hybridoma Bank e mantidos na Universidade de Iowa, Departamento de Biologia, Iowa City, IA 52242.

Após sequência de três lavagens por 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado (Amersham™ ECL™ Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody cód: NA931) associado à peroxidase por 2h à temperatura ambiente, diluído em 1:5000. A detecção das proteínas na membrana foi realizada por quimioluminescência com o kit ECL Western Blottin Detection Reagents (Amersham, UK) por 40 minutos para actina e 5 minutos para as demais, em temperatura ambiente, seguindo as recomendações do fabricante. A revelação foi realizada com exposição da membrana ao filme de raio-X AmershamHiperfilm™ ECL (GE healthcare, Buckinghamshire, UK) por 3 minutos em temperatura ambiente.

Tabela 2 - Anticorpos primários

Referência	Espécie antígeno	Espécie hospedeira	Isotipo	Especificidade	Diluição
224-236-1	Dictyostelium discoideum	Camundongo	MIgG1	Actina	1:2000
BA-D5	Bovino	Camundongo	IgG2b	MHC-I	1:2000
BF-F3	Bovino	Camundongo	IgM	MHC-IIb	1:2000
SC 32233	Coelho	Camundongo	IgG	GAPDH	1:2000

3.6.3 Análise da densidade óptica

Os filmes radiográficos contendo as bandas de interesse foram digitalizados por meio de um scanner HP Deskjet Ink Advantage 3546 com resolução de 300 pontos por polegada (dpi) e as imagens salvas em formato tiff (Tagged Image File Format) em 8 bits representada por 256 tons de cinza, onde 0 é igual a preto e 256 corresponde ao branco. Para avaliar a

densidade ótica das imagens foi utilizado o programa de edição de imagem Adobe Photoshop 6.0 (*Adobe System Incorporated*, São Jose, Ca 95110-2704 USA), o qual possui o recurso de quantificação dos níveis de cinza.

Com o objetivo de diminuir o efeito de plano de fundo (background), optou-se por realizar a análise das imagens de forma invertida (FIGURA 7), pois os valores da quantificação dos níveis de cinza da imagem invertida, acompanham as mesmas tendências dos valores das densidades óticas (TAVANO *et al.*, 2000)

O programa Adobe Photoshop oferece várias ferramentas, as quais foram utilizadas para realização desse trabalho.

Figura 7 - Imagem de filme radiográfico contendo bandas de interesse

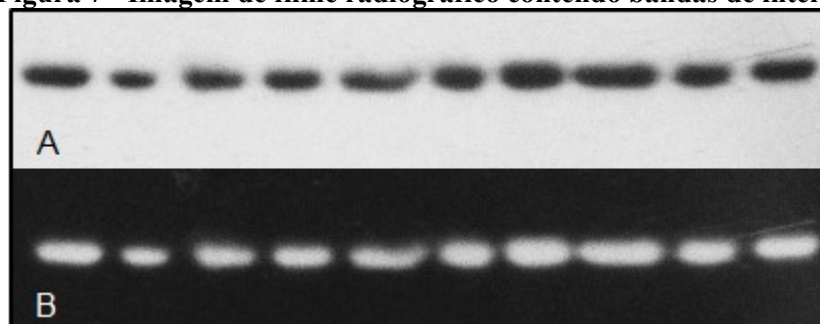


Imagem normal (A); imagem invertida (B)
Fonte: Elaborada pelo autor

Após abrir a imagem no programa, selecionou-se *imagem > ajustes > inverter* para inverter a imagem. Em seguida, na barra lateral esquerda, selecionou-se *Ferramenta Letreiro Retangular* para definir a forma retangular. Logo após, na barra superior em *Estilo: Tamanho Fixo* determinou-se um retângulo com largura de 70 pixels e altura de 40 pixels. Depois deslocou-se a forma sobre a primeira faixa de densidade e clicamos em *histograma*, na barra lateral direita, que mostrou como resultado a média, a mediana e o desvio padrão para os níveis de cinza da área selecionada. Repetimos o mesmo procedimento para todas as faixas de diferentes exposições em todos os grupos (TAVANO *et al.*, 2000; GASSMANN *et al.*, 2009).

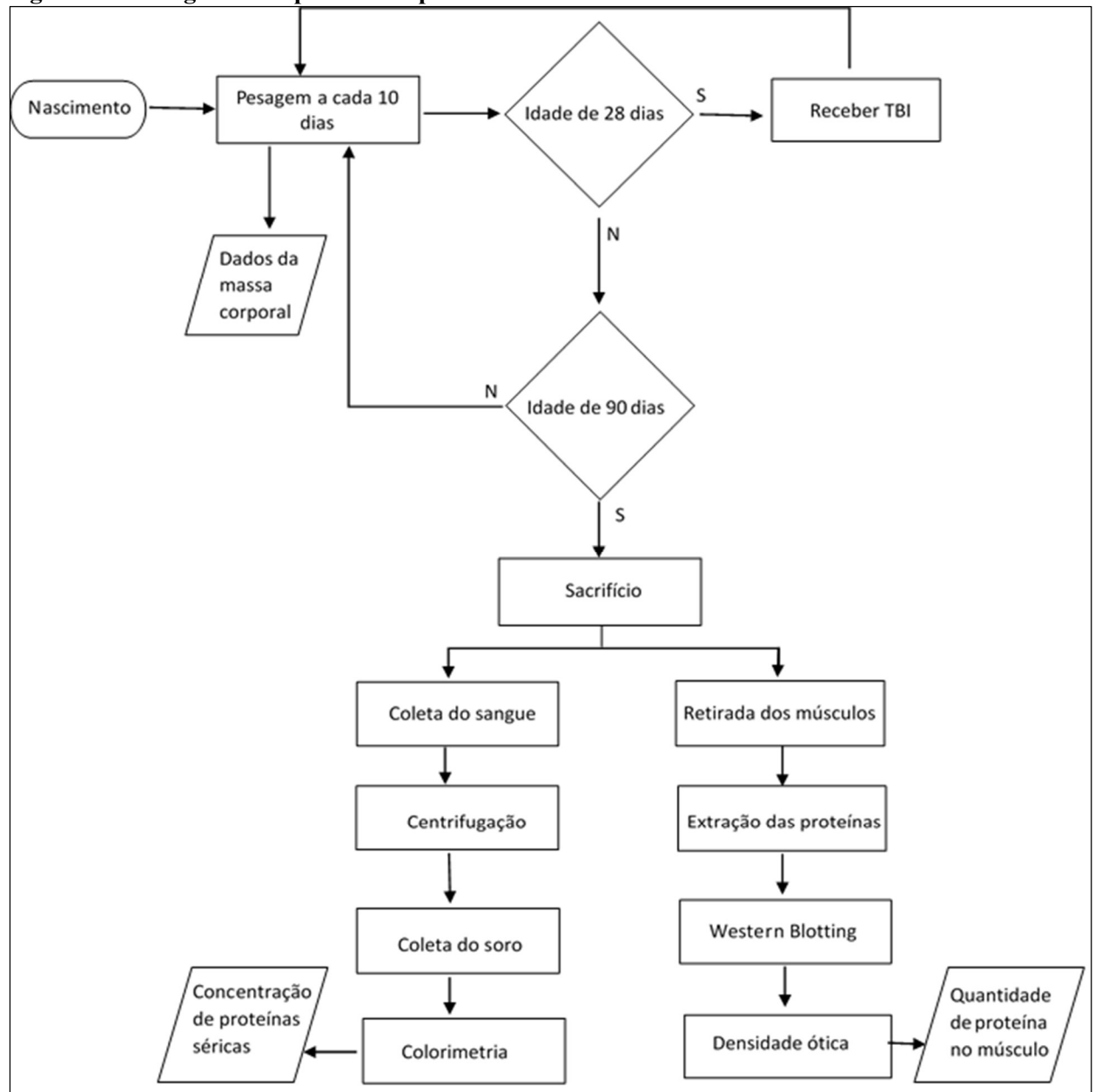
Os valores das médias dos níveis de cinza foram registrados e utilizados para a quantificação da densidade ótica das proteínas de interesse, tomando-se como referência a proteína GAPDH. Logo, a quantificação foi realizada através do cálculo da relação da expressão entre as proteínas de interesse e a proteína GAPDH.

Para se evitar erro de padronização, a banda de controle foi padronizada em si mesma. Isto significa que o valor médio da banda de controle, já normalizada, foi definido como 1 e todos os outros valores das outras bandas foram expressos como múltiplos da alteração

relativamente ao controle (isto é aceitável que uma pequena quantidade de amostra) (MCLEAN, 2011).

Na Figura 8 é apresentado um fluxograma indicando as etapas experimentais, iniciando com o nascimento dos animais e finalizando com a coleta das variáveis de interesse.

Figura 8 - Fluxograma do processo experimental



S = sim; N = não

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a testes de homogeneidade e normalidade. Uma análise de variância bidimensional (ANOVA – 2 FATORES) foi usada para comparar os diferentes grupos tratados, seguida de análise post-hoc com teste de comparações múltiplas de *Tukey* e determinação do tamanho do efeito (*ES*). Nos casos onde as comparações foram entre dois grupos, adotou-se o teste *t* de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para indicar diferenças. Os testes foram realizados utilizando o GraphPadPrism® versão 6.0 para Windows (GraphPad Software Inc. San Diego / CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Acompanhamento do Perfil Ponderal de Ganho de Massa Corporal

Na Tabela 3 são apresentados as médias dos valores ponderais referentes ao ganho de massa corporal. As massas corporais foram obtidas a cada 10 dias de intervalo, no período compreendido entre o 30º e o 90º dias de vida.

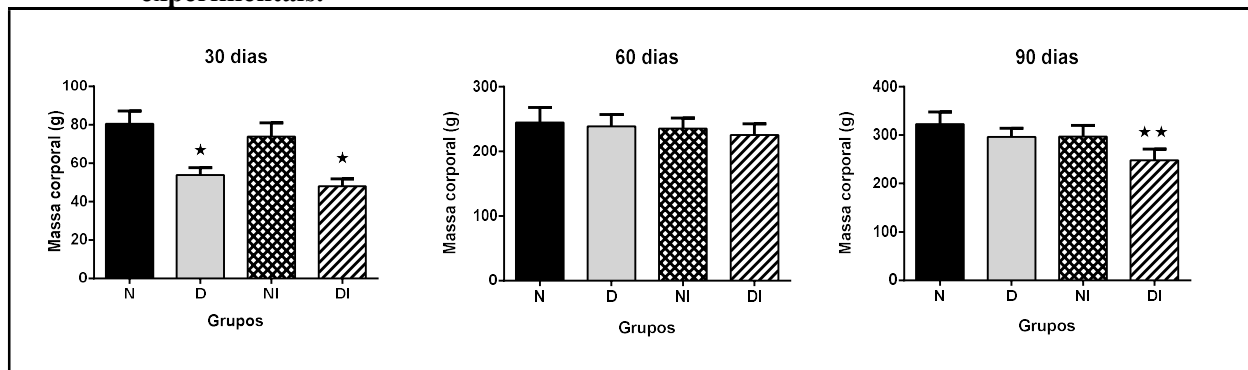
Tabela 3 - Valores médios de massa corporal em gramas compreendendo o período de 30 a 90 dias de idade.

Dias	Massa corporal (g)			
	Grupos n=9			
	N	D	NI	DI
20	41,67±2,47	24,90±1,70	36,67±2,93	24,61±1,52
30	80,42± 4,13	53,90± 3,60 ^{a,b}	73,83 ± 7,71	48,06± 3,73 ^{a,b}
40	148,60± 6,91	116,50± 8,77	131,10± 12,10	117,06± 18,63
50	195,50± 37,35	188,50± 37,81	180,89± 14,70	161,06± 17,22
60	244,90± 22,95	238,80± 17,20	235,28± 14,87	225,44± 17,55
70	279,17± 34,45	270,10± 15,05	256,56± 10,88	230,67± 16,99
80	308,62±43,26	290,50± 20,36	282,78± 11,65	240,39± 20,31
90	322,77± 25,27	296,15± 23,25 ^{a,c}	296,78± 11,65 ^{a,c}	247,67± 23,53 ^a

Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão obtido a partir de 9 ratos de 2-3 ninhadas diferentes em cada grupo experimental. N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado; n- número de animais. ^aDiferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N. ^b Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a NI. ^c Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a DI. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de *Tukey*.

A Figura 9 permite as comparações dos valores médios das massas corporais após 30, 60, e 90 dias de vida, permitindo-se observar que aos 60 dias os grupos não apresentam diferenças entre si.

Figura 9 - Valores médios da massa corporal aos 30, 60 e 90 dias de vida para os quatro grupos experimentais.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão, obtido a partir de 9 ratos de 2 ou 3 ninhadas diferentes em cada grupo experimental. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de Tukey. ★ Diferença significativa em relação a N e NI; ★★ Diferença significativa em relação a N, D e NI.

Como bem reportado na literatura, ratos desnutridos durante o período gestacional e lactação apresentam baixo peso ao nascer (NEIVA *et al.*, 1999; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; FALCÃO-TEBAS *et al.*, 2012; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). Uma das possíveis explicação para o entendimento deste fenômeno trata-se da metilação de glicoproteínas específicas da gravidez. Placentas de camundongos expostas a dietas de restrição calórica ou *ad libitum*, foram examinadas e foi encontrado aumento de α fetoproteínas que é um marcador de crescimento intrauterino restrito, bem como aumento na metilação do fator de crescimento fetal (Igf2), prejudicando o crescimento do feto (CHEN *et al.*, 2013).

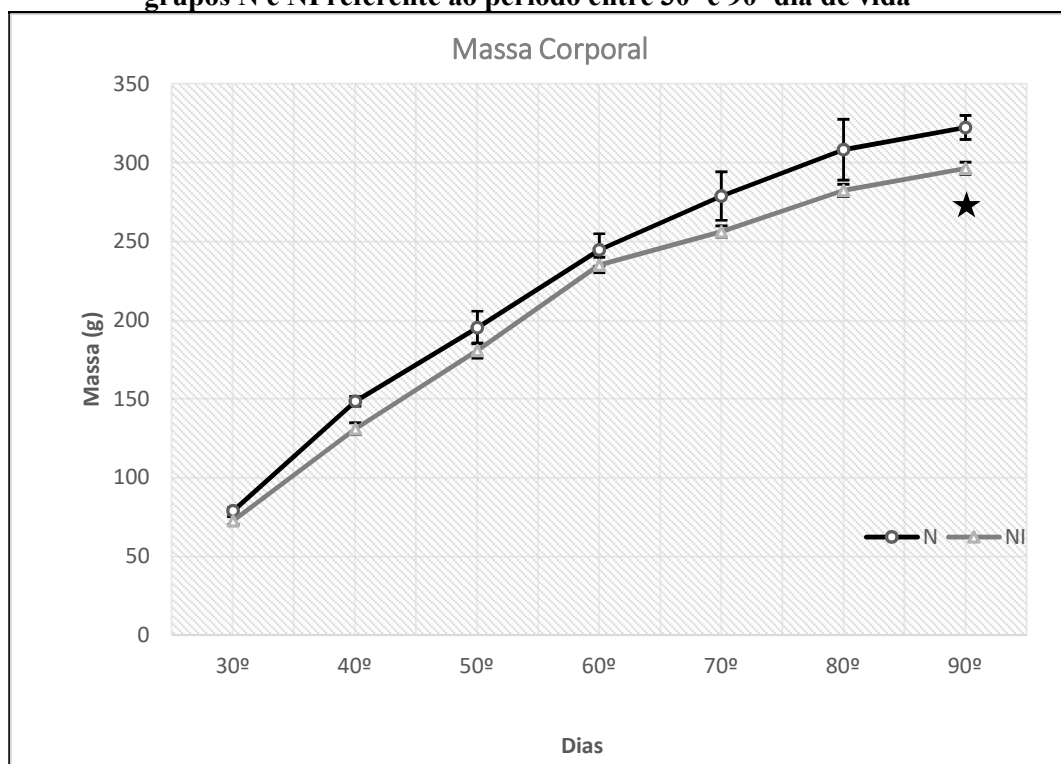
Neste estudo foi observado que os animais pertencentes aos grupos D e DI comparados ao grupo N apresentaram diferenças ($p < 0,05$) em relação ao ganho de massa corporal aos 30 dias, (TABELA 3 e FIGURA 9), corroborando com os outros estudos que usaram este tipo de intervenção (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2008; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014; ALHEIROS-LIRA *et al.*, 2015). Entretanto, um ponto que chama a atenção é o fato de que não foram observadas diferenças desta variável aos 60 dias de vida, quando comparados os grupos entre si, o que também foi constatado por De Santana Muniz *et al.*, (2013) em seu estudo utilizando a mesma dieta durante o período perinatal, quando comparam os grupos normonutridos e desnutridos. Isto pode estar associado à maturação sexual (LEE *et al.*, 1975), ou a um aumento na taxa de crescimento, através de processo compensatório

(WILLIAMS *et al.*, 1974), o que sugere, em estudos futuros, uma investigação mais detalhada neste período de vida.

Por outro lado, foi observada, aos 90 dias de vida, redução do ganho de massa corporal com diferença estatística entre o grupo DI e os demais grupos N, D, NI, o que parece ser decorrente dos efeitos deletérios da desnutrição e da radiação que persistiram ao longo da vida, embora não tenha sido observado interação entre os fatores desnutrição e irradiação neste período, logo cada fator agiu separadamente sem interferir no outro. A radiação ($SE=0,85$) parece afetar o ganho de massa corporal semelhantemente a desnutrição perinatal ($SE=0,87$), pois o grupo NI, que sofreu exclusivamente o efeito da radiação, mostrou-se semelhante ao grupo D, que foi submetido apenas a desnutrição (MUCERINO *et al.*, 1995), ambas apresentaram tamanho do efeito considerados grande pela escala “d” de Cohen (LOUREIRO e GAMEIRO, 2011).

A Figura 10 apresenta a evolução do ganho de massa corporal para os grupos N e NI, alimentados com dieta normoproteica durante a gestação e lactação. Os dados foram analisados por teste t de Student.

Figura 10 - Evolução do ganho de massa corporal dos animais pertencentes aos grupos N e NI referente ao período entre 30º e 90º dia de vida

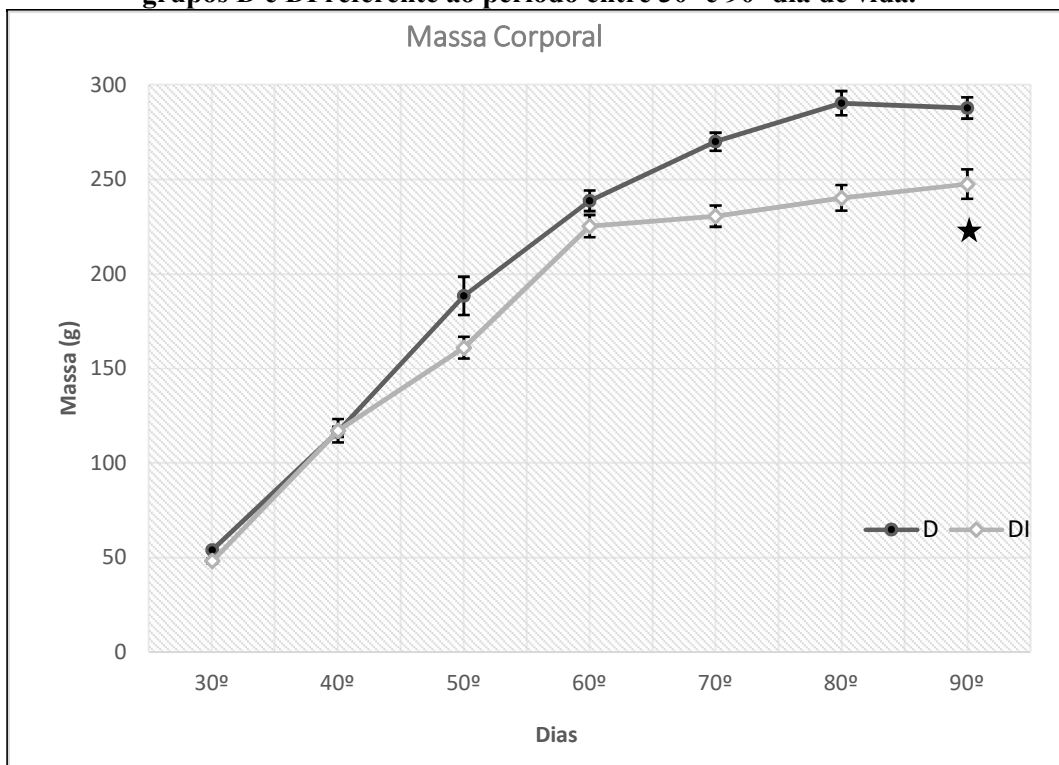


N-grupo normonutrido; NI- grupo normonutrido irradiado;

★ Diferença significativa aos 90 dias de vida $p = 0,0304$. Teste t Student

Na Figura 11, podemos observar o ganho de massa corporal para os grupos D e DI, os quais foram alimentados com uma dieta hipoproteica e isocalórica. Os dados foram analisados por teste t de Student.

Figura 11 - Evolução do ganho de massa corporal dos animais pertencentes aos grupos D e DI referente ao período entre 30º e 90º dia de vida.



D-grupo desnutrido; DI- grupo desnutrido irradiado

★ Diferença significativa aos 90 dias de vida $p = 0,0001$. Teste t Student

As figuras 10 e 11 permitem constatar a influência da irradiação na evolução do ganho de massa corporal, considerando os grupos com a mesma dieta. Os resultados indicam que uma dose baixa de TBI impacta negativamente na evolução do ganho de massa corporal, pois ao longo do tempo os animais que foram expostos à radiação aguda de corpo inteiro apresentam massa corporal sempre abaixo em relação aos que não receberam. Aos 90 dias, essa diferença entre os pares de grupos é significativa, principalmente entre os desnutridos, confirmando que os condicionamentos que incluem a radioterapia corporal total estão associados à deficiência do hormônio de crescimento, afetando o desenvolvimento corporal dos sujeitos expostos. (CASTRO JR *et al.*, 2001; IAEA, 2010)

4.2 Proteínas Totais e Albumina no Soro Sanguíneo

Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações de proteínas totais e de albumina, presentes no soro sanguíneo aos 90 dias de vida.

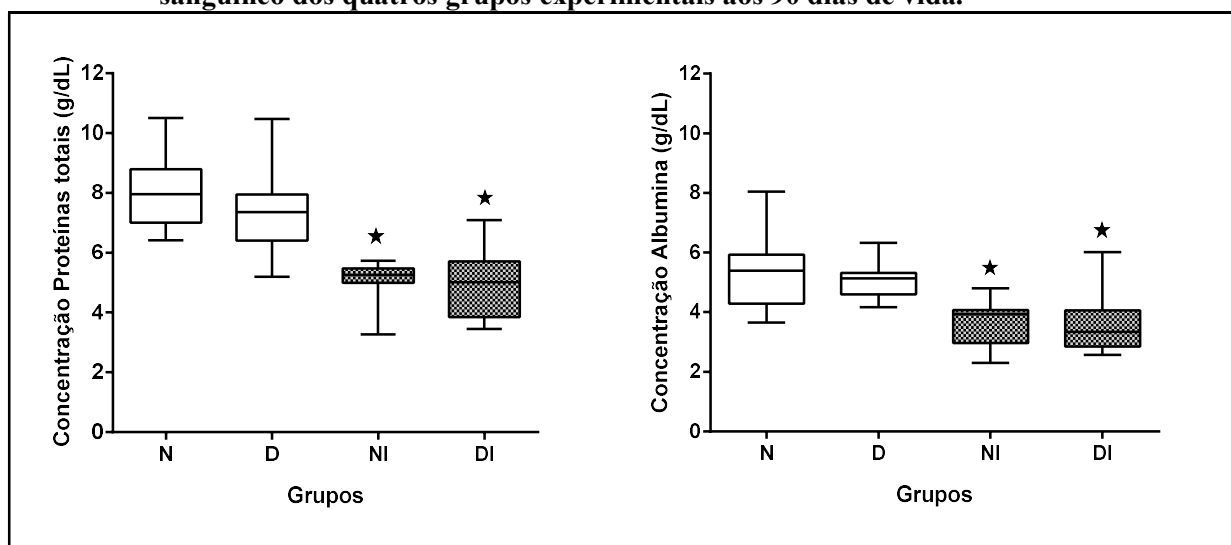
Tabela 4 - Valores médios de proteínas totais e albumina plasmáticas aos 90 dias de vida.

Grupos n=9	Proteínas Totais (g/dL)	Albumina (g/dL)
N	8,06 ± 1,25	5,35 ± 1,30
D	7,37 ± 1,52	5,07 ± 0,62
NI	5,08 ± 0,73 ^{a,b}	3,68 ± 0,79 ^{a,b}
DI	4,93 ± 1,19 ^{a,b}	3,62 ± 1,04 ^{a,b}

Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão obtido a partir de 9 ratos de 2-3 ninhadas diferentes em cada grupo experimental. N- grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado; n- número de animais. ^aDiferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N; ^b Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a D.

A Figura 12 mostra o comportamento dos níveis de proteínas totais e albumina séricas nos quartos grupos experimentais aos 90 dias de vida, pode-se notar que os grupos que sofreram irradiação apresentam níveis de concentração menores quando comparados com os grupos não irradiados.

Figura 12 - Boxplots referentes à quantidade de proteínas totais e Albumina encontradas no soro sanguíneo dos quatros grupos experimentais aos 90 dias de vida.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado
 ★ Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N e D. Os dados foram analisados por ANOVA. $SE = 1,378$ para proteínas totais e $SE = 0,492$ para Albumina.

Os aspectos metabólicos dos tecidos animais podem ser estudados indiretamente pela composição bioquímica do plasma sanguíneo, de forma a poder avaliar transtornos no funcionamento de órgãos, adaptações diante de desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrios metabólicos específicos, além de oferecer subsídios na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular, permitindo inferir sobre o estado geral do paciente (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002). Entretanto a interpretação do perfil bioquímico é complexa devido aos mecanismos que controlam os metabólitos sanguíneos como também a fatores ligados à idade, raça, clima e stress (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Como bem relatado na literatura, a desnutrição provoca a diminuição da síntese de albumina, a mais abundante proteína plasmática, tendo como uma importante função a manutenção do volume plasmático circulante, sendo responsável pela pressão coloidosmótica (WHICHER e SPENCE, 1987; SANTOS *et al.*, 2004). Os resultados encontrados nos animais submetidos à desnutrição no período gestacional e lactação (D), aos 90 dias de vida, não apresentaram diferenças quanto às concentrações de albumina no soro sanguíneo em relação ao grupo controle (N), o que também foi constatado por De Brito Alves e colaboradores (2014). Entretanto, os grupos NI e DI, submetidos à TBI, apresentaram baixos níveis de concentração plasmática de proteínas totais e albumina, sugerindo que a irradiação de corpo inteiro provocou uma ativação na via de degradação proteica ($SE= 1,19$), e que se mantém até a vida adulta.

Outros estudos com ratos irradiados de corpo inteiro (VASILE *et al.*, 2009; NWOKOCHA *et al.*, 2012b; NWOKOCHA *et al.*, 2012a; WANG *et al.*, 2015) observaram também que o nível de proteínas totais e albumina no soro sanguíneo apresentaram queda em suas concentrações. Entretanto, estes estudos não verificaram as concentrações após um longo período de tempo. Moulder e colaboradores (2004), semelhantemente a este estudo, verificaram que uma dose de radiação de 17 Gy com taxa de 1,73 Gy/min, em ratos, induziu proteinúria associada com baixos níveis de proteínas totais e albumina e os animais desenvolveram insuficiência renal após 38 semanas da irradiação. Comparativamente, a dose utilizada no estudo citado foi 6,8 vezes maior que a aplicada neste estudo (2,5 Gy com taxa de 75 cGy/min), sinalizando que baixas doses de radiação também são capazes de provocar alterações na síntese proteica de forma permanente. A expressão "hormesis da radiação" refere-se à hipótese de que a radiação ionizante, em doses que estão imediatamente acima de níveis naturais de fundo podem produzir efeitos benéficos, estimulando a ativação de mecanismos compensatórios e de reparação, tais como a regulação das respostas antioxidantes, a ativação de mecanismos de reparação enzimática do DNA e a ativação do sistema imunológico. Estas doses de radiação

têm efeitos biológicos cuja intensidade e relevância são, no entanto a priori, complexas para se prever (GORI e MUNZEL, 2012). A relação dose-resposta de algumas das alterações induzidas pela radiação é fácil de se determinar e seguem uma curva linear em que uma dose maior corresponde a danos maiores (os chamados efeitos determinísticos), enquanto que no modelo não linear isto não acontece, pois a probabilidade do aparecimento das alterações aumenta exponencialmente com o aumento da exposição (GORI e MUNZEL, 2012).

Outras espécies de mamíferos como cães, porco e primatas também exibem alterações fisiológicas e histológicas semelhantes às observadas em humanos, com lesão renal induzida por radiação, mas o intervalo de tempo entre a irradiação e o desenvolvimento de doença renal varia, ocorrendo mais cedo em relação aos humanos (AUGUSTINE *et al.*, 2005).

A evolução das concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina aos 90 dias nos grupos NI e D é outra observação interessante para o presente estudo indicando que, embora não haja diferenças para a massa corporal entre estes grupos, a irradiação isoladamente pode afetar os indivíduos mesmo em condições nutricionalmente adequadas afetando as concentrações séricas destas proteínas. No que diz respeito aos grupos NI e DI, não foram observadas diferenças em relação às concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina para este mesmo período, apesar da significativa diferença para massa corporal, sugerindo que o acompanhamento da evolução do ganho de massa corporal isoladamente, não é um indicador confiável do estado geral de saúde. Também não foi observada interação entre desnutrição e irradiação.

Outros fatores, tais como o tipo de radiação, dose absorvida e taxa de dose, que podem acarretar efeitos secundários induzidos pela radiação ionizante e alterar o estado de saúde, dependem de componentes genéticos e epigenéticos, que reflete diretamente na radiosensibilidade do indivíduo. Neste sentido, existem populações com genótipos que induzem radiosensibilidade e podem aumentar o risco de se desenvolver câncer com exposições de baixas doses (AUGUSTINE *et al.*, 2005). Neste estudo, a variabilidade genética interindividual foi também simulada ao se estudar três famílias diferentes de ratos, enquanto que a condição nutricional foi o único fator epigenético considerado dissemelhante nesta pesquisa (KANHERKAR *et al.*, 2014).

4.3 Expressão das Proteínas Contráteis Musculares

A quantificação da expressão de actina e miosina no músculo esquelético de vertebrados tem sido objeto de muitos estudos desde a década de 50. O interesse inicial foi primeiramente a identificação dos componentes proteicos das bandas A e I das miofibrilas e posteriormente, a relação do conteúdo entre os valores de actina e miosina no modelo de filamentos deslizantes da contração muscular. Posteriormente, tentativas foram feitas para relacionar estes valores com os modelos de estrutura do filamento grosso (YATES e GREASER, 1983).

Este estudo procurou entender como a radiação ionizante age sobre as proteínas contráteis do músculo esquelético em indivíduos eutróficos ou precocemente desnutridos que fazem uso da TBI. Para isto, ratos desnutridos no período perinatal foram submetidos a irradiação de corpo inteiro aos 28 dias de vida e as proteínas contráteis (actina e miosina), dos músculos Sóleo e EDL, foram analisadas por meio do método de *Western blotting*.

A seguir são apresentados os resultados da expressão das proteínas contráteis musculares para cada músculo, determinadas por espectrofotometria.

4.3.1 Músculo Sóleo

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios da quantificação relativa da densidade ótica das bandas, correspondendo às proteínas contráteis presentes no músculo Sóleo de ratos submetidos a TBI de 2,5 Gy e com desnutrição perinatal, com idade de 90 dias. Os valores foram obtidos pela relação da proteína de interesse e a proteína GAPDH.

Tabela 5 - Valores médios da quantificação relativa da densidade ótica das bandas correspondendo as proteínas contráteis do músculo Sóleo de ratos com 90 dias após desnutrição perinatal e TBI de 2,5 Gy normalizados por GAPDH.

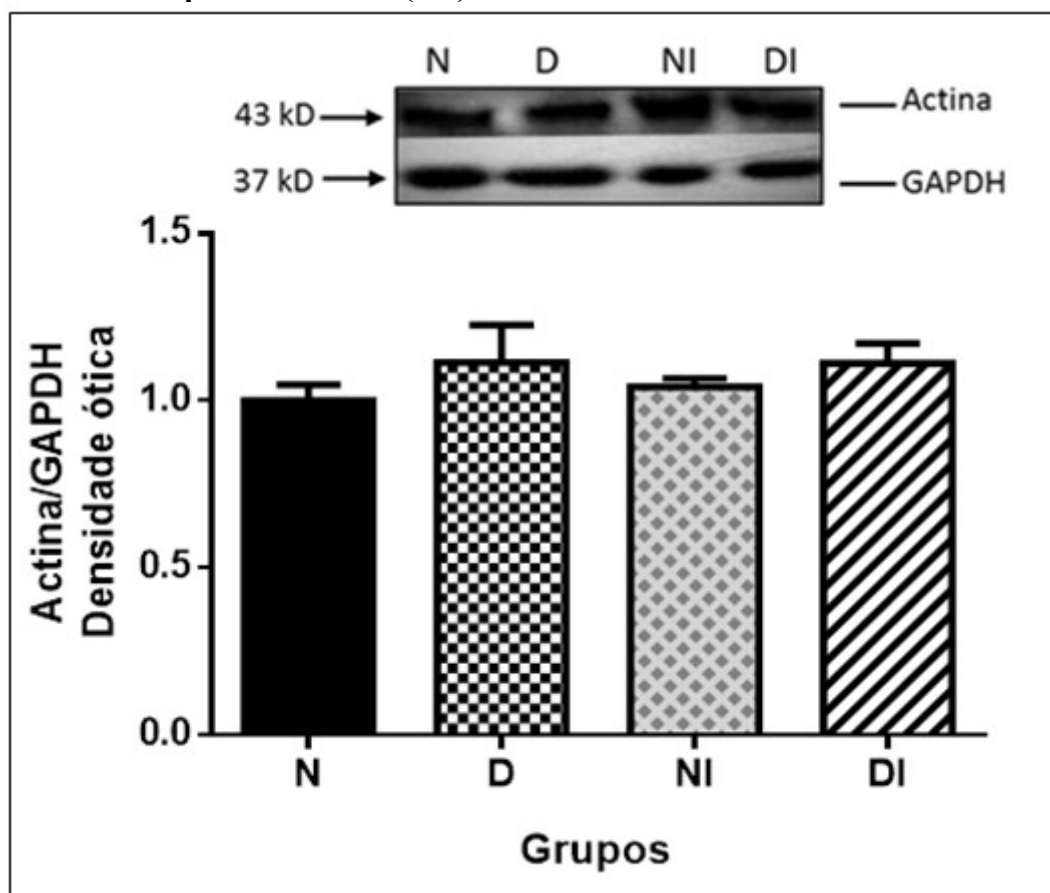
Proteínas	Grupos			
	N	D	NI	DI
Actina	0,99 ± 0,05	1,11 ± 0,17	1,03 ± 0,02	1,10 ± 0,06
Miosina I	0,74 ± 0,15	1,13 ± 0,07	0,68 ± 0,10	0,94 ± 0,10
Miosina IIB	0,60 ± 0,06	0,48 ± 0,08	0,93 ± 0,13	0,64 ± 0,14

Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão obtido a partir dos diferentes grupos experimentais. N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado.

4.3.1.1 Análise da expressão da proteína actina

Na Figura 13 podemos observar a expressão de actina no músculo Sóleo, para os diferentes grupos experimentais ($N=1,00\pm0,05$; $D=1,11\pm0,11$; $NI=1,04\pm0,02$; $DI=1,11\pm0,06$) no 90º dia de vida após os insultos da desnutrição e irradiação, padronizadas relativamente ao grupo normonutrido. Para isto o valor da expressão proteica do grupo N foi considerado igual a 1 e os demais grupos apresentados em números de vezes maior ou menor ao controle.

Figura 13 - Expressão de actina em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de Tukey.

Com a intenção de melhor entender os efeitos causados pelos tratamentos aplicados neste estudo, inicialmente cada tratamento foi analisado separadamente. Ao se comparar os grupos N e NI, a fim de verificar apenas o efeito da TBI ($SE=0,15$), observa-se que a irradiação não provocou alteração na expressão de actina ($p=0,0772$). Brach e colaboradores (1991) analisando os efeitos da radiação ionizante sobre o fator de transcrição NF-kB em células humana com leucemia mieloide (KG-I) em doses de 2 a 50 Gy constatou que a radiação não

interfere sobre a expressão do gene da actina. Em outro estudo, Gubina e colaboradores (2010) investigando os níveis de transcrição do DNA mitocondrial, em músculos esqueléticos de ratos, após dose de 10 Gy de raio-X, verificou que a diminuição da transcrição mitocondrial não foi resultado de danos no aparato de transcrição celular, pois a atividade nuclear do gene da beta-actina permaneceu inalterado após a irradiação. Estes resultados encontrados nos estudos mencionados, como também neste estudo, reforçam a hipótese de que a radiação não interfere na expressão proteica da actina.

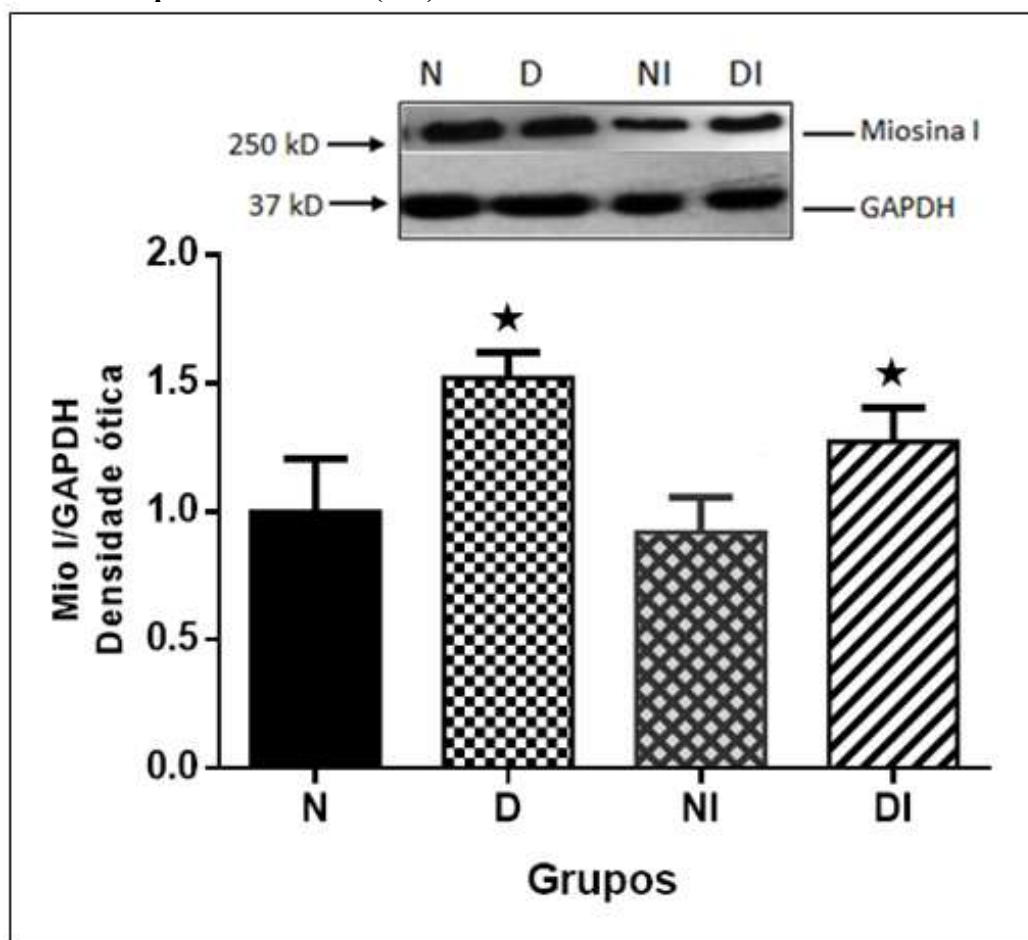
Comparando-se o grupo N com o grupo D ($p=0,080$), observa-se que não existe diferença estatística, sugerindo que a desnutrição não provocou aumento na expressão de actina neste músculo, embora este fator apresente um tamanho de efeito ($SE=0,74$) considerado médio pela escala “d” de Cohen (LOUREIRO e GAMEIRO, 2011). Estudos que aplicaram unicamente modelos de desnutrição perinatal em ratos de 90, 180 e 365 dias de vida (BEDI *et al.*, 1982; OUMI *et al.*, 2000,2001; TOSCANO *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008) observaram que este tipo de intervenção promoveu alterações metabólicas, estruturais e funcionais no músculo esquelético, como, por exemplo, déficits na massa muscular e diminuição da área de secção transversal da fibra, entretanto, estes estudos não quantificaram as expressões da proteína actina.

Ainda na Figura 13, verifica-se que a expressão proteica da actina no músculo Sóleo não apresentou, após as condições impostas por este experimento, diferenças estatisticamente significativas. Tanto a irradiação como a desnutrição não foram capazes de causar alterações na expressão da actina, nos grupos experimentais submetidos a estes tratamentos. Também foi constatado que não existe interação entre os dois tratamentos aplicados neste estudo ($p=0,4804$), indicando que os efeitos da desnutrição não interferiram sobre os efeitos da irradiação e vice-versa.

4.3.1.2 Análise da expressão da proteína miosina I

A Figura 14 apresenta a expressão proteica de miosina I no músculo Sóleo nos mesmos grupos experimentais ($N=1,00\pm0,21$; $D=1,52\pm0,10$; $NI=0,92\pm0,14$; $DI=1,27\pm0,13$) submetidos às mesmas condições deste estudo, ou seja, desnutrição perinatal e irradiação de corpo inteiro. Os resultados estão padronizados relativamente ao grupo normonutrido.

Figura 14 - Expressão de miosina I em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. ★ Diferença estatística para $p < 0,05$ em relação a N e NI. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de Tukey.

Comparando-se na Figura 14 os grupos normonutridos entre si (N e NI), como também os grupos desnutridos (D e DI), estes parecem apresentar valores similares para a expressão de miosina I, porém quando a exposição à radiação ionizante é analisado em separado, não se observa diferença estatística entre o grupo N e NI ($p=0,622$), sugerindo que a TBI ($SE=0,68$) não provocou redução na expressão proteica da miosina I. Litten e colaboradores (1989) avaliaram as alterações nas proporção de miosina I presente em coração de ratos submetidos a irradiação de corpo inteiro, com dose de 5 Gy aos 90 dias de vida, e constataram que a miosina I aumentou seu percentual para 55% somente entre o nono e trigésimo dia após a irradiação, não sendo observadas alterações em relação ao controle, entre o 3º e 12º mês após a irradiação. Apesar de se tratar da mesma proteína, os parâmetros avaliados no estudo anteriormente citado diferem deste estudo, o que pode justificar a divergência dos resultados.

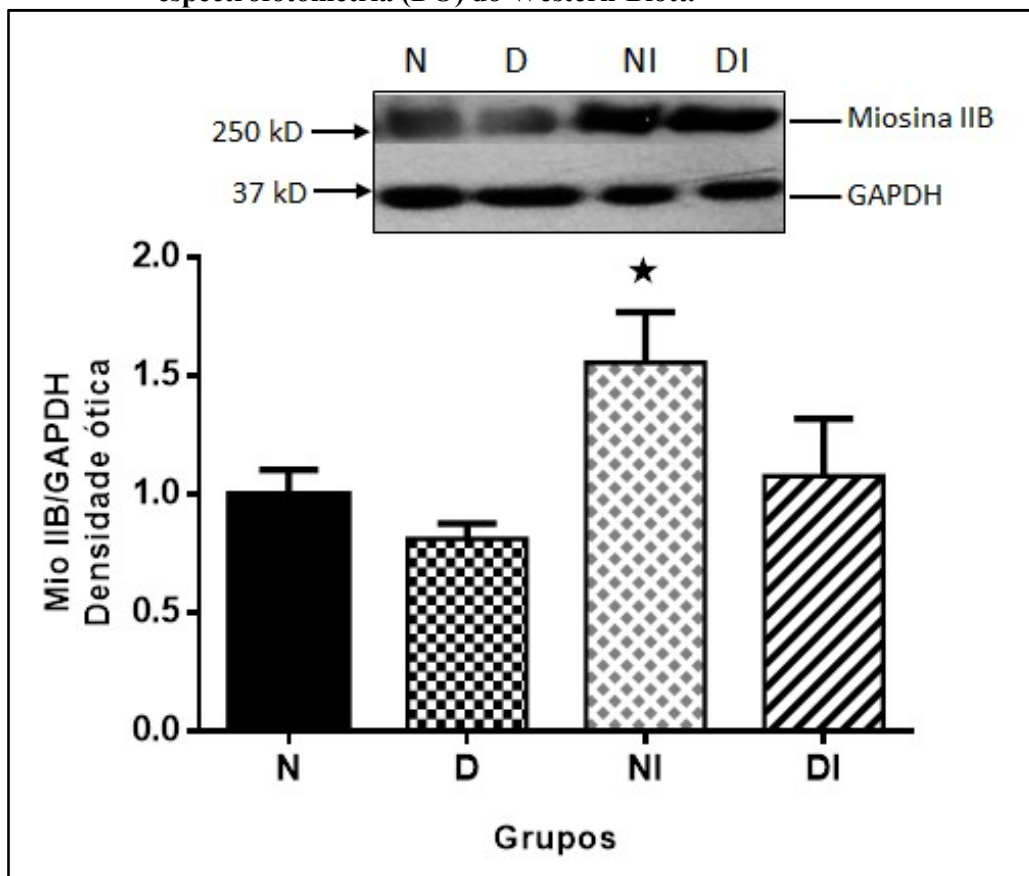
Analisando isoladamente o efeito da desnutrição ($SE=1,69$), comparando o grupo controle normonutrido N com o grupo desnutrido D ($p = 0,0003$), verifica-se que o grupo D apresenta uma alta expressão de miosina I em relação ao grupo N, cerca de 1,5 vezes a mais, sugerindo que o modelo de desnutrição, adotado neste estudo, provocou um aumento na expressão desta proteína muscular. Estes achados vão de encontro a outros estudos (TOSCANO *et al.*, 2008; DA SILVA ARAGAO *et al.*, 2013) que quantificaram o número de fibras tipo I em músculos de ratos desnutridos precocemente, durante a gestação e lactação, por meio da atividade enzimática (mATPase) e não encontraram diferenças estatísticas na quantidade de fibras tipo I. Embora o modelo de desnutrição tenha sido semelhante ao adotado neste estudo, Da Silva Aragão e colaboradores (2013) investigaram as alterações aos 120 dias de vida, o que pode justificar esses resultados opostos. Além de que, o método histoquímico resulta numa avaliação qualitativa do complemento de miosina e, por conseguinte, a capacidade de delinear a multiplicidade de fibras híbridas potenciais é limitada. A eletroforese é o método mais informativo para a avaliação de perfis de isoformas de MHC, pois este método produz importantes informações quantitativas, especialmente pertinentes quando duas ou mais isoformas de MHC são expressas em proporções variáveis e também permite a detecção de isoformas de MHC (PETTE e STARON, 2000).

Analisando os efeitos da desnutrição e irradiação simultaneamente, os resultados indicam que não ocorreu interação entre os fatores ($p = 0,338$). Isto é comprovado quando se compara, os grupos N e DI ($p = 0,049$) e os grupos D e DI ($p=0,078$), na primeira comparação observa-se que DI apresenta maior expressão da miosina I em relação a N, ao mesmo tempo que, em relação ao grupo D, este não apresenta diferença na expressão proteica, indicando que a desnutrição promoveu o aumento da expressão proteica de miosina I sem interferência da TBI. Ou seja, cada fator agiu separadamente, sem nenhuma interação.

4.3.1.3 Análise da expressão da proteína miosina IIB

As expressões de miosina IIB no músculo Sóleo, determinadas por densidade ótica da banda do gel de eletroforese detectada por Western-Blott, com anticorpo específico para proteína miosina IIB foram padronizadas relativamente ao grupo normonutrido e são apresentadas na Figura 16, para os quatro grupos experimentais ($N=1,00\pm0,10$; $D=0,81\pm0,13$; $NI=1,56\pm0,21$; $DI=1,08\pm0,24$).

Figura 15 - Expressão de miosina IIB em amostras de músculo Sóleo de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. ★ Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N, D e DI. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post teste de Tukey.

Comparando-se inicialmente, o grupo N ao grupo NI, a fim de verificar apenas o efeito da TBI ($SE=1,3$) sobre a expressão de miosina IIB no músculo Sóleo, verifica-se que existe diferença estatística ($p = 0,001$), sugerindo que a TBI provocou aumento na expressão da miosina IIB neste músculo, o que pode ser observado na Figura 15, onde o grupo NI apresenta-se com cerca de 1,5 vezes a mais na expressão desta proteína, quando comparado ao grupo N. Como já mencionado anteriormente, o músculo Sóleo possui metabolismo predominantemente oxidativo, o que caracteriza a presença em maior quantidade da miosina I. Deste modo, podemos concluir que no grupo NI, a radiação foi capaz de alterar a tipologia do músculo devido às condições impostas, fazendo com que ocorresse uma mudança na sua composição, ou seja, aumento de miosina IIB e redução de miosina I (TABELA 5).

O músculo esquelético de mamíferos é um tecido heterogêneo, composto por uma grande variedade de tipos de fibras. Estas fibras, entretanto, são altamente versáteis, capazes de

responder às exigências funcionais em função de demandas fisiológicas, mudando seus perfis fenotípicos. Esta capacidade de resposta adaptativa é a base das transições dos tipos de fibra (AGBULUT *et al.*, 2003). A população de fibras de um dado músculo está em um estado dinâmico, ajustando-se constantemente às condições atuais influenciadas por vários fatores, tais como desenvolvimento, inervação, aumento e diminuição da atividade neuromuscular, da atividade física, hormônios e envelhecimento (BOFF, 2008). No entanto, é claro que as transições no tipo de fibra não acontecem em saltos imediatos de um extremo a outro, mas ocorrem de forma sequencial, classificada e ordenada. No aspecto molecular, essas transições graduais são observadas através das trocas de isoformas da cadeia pesada de miosina, o que implica em uma sequência que vai da mais rápida (MHCI**b**) para a mais lenta (MHCI), e vice-versa (PETTE e STARON, 1997; AGBULUT *et al.*, 2003)

Buller e colaboradores (1960) investigaram a plasticidade muscular com relação à expressão das cadeias pesadas da miosina e sua capacidade de adaptação em músculos de gatos e concluíram que quando um músculo lento como o Sóleo é reinervado por fibras nervosas, que normalmente inervam músculos rápidos, a sua velocidade de contração aumenta. Esse processo engloba a transição de fibras lentas para rápidas, com alterações sequenciais na composição das cadeias pesadas da miosina, o que reforça a capacidade adaptativa do tecido muscular em função da maior concentração do tipo de miosina presente, levando a uma alteração da função.

Huang e colaboradores (2016) realizam um estudo com objetivo de desenvolver e aplicar um fluxo de trabalho de proteômica quantitativa, que permitisse determinar as redes de proteínas e os caminhos sensíveis às baixas doses de radiação ionizante (1 Gy) no hipocampo de ratos, pós treinamento condicionado. Esses pesquisadores observaram desregulação de 73 proteínas, num total de 399 estudadas, dentre elas algumas também presentes na fibra muscular, indicando efeitos adversos da radiação sobre a mielinização. Outras alterações proteicas, indicaram mudanças das vias do metabolismo energético, possivelmente no ciclo do ácido tricarboxílico para a utilização de glutamato, a fim de suprir às necessidades de ATP e alteração de proteínas associadas com a atividade sináptica e neurotransmissão. Embora não se conheça exatamente o que provocou o aumento da expressão da miosina IIB no grupo NI, este resultado sugere que este aumento possa ter acontecido devido a alterações das proteínas ligadas a atividades sinápticas como proposto por Huang e colaboradores (2016).

Em relação à desnutrição, observa-se que não houve diferença estatística na expressão de miosina IIB entre os grupos N e D ($p = 0,271$), N e DI ($p = 0,906$) e D e DI ($p = 0,087$), indicando que este insulto durante a gestação e lactação não foi capaz de alterar a expressão

desta proteína, embora o tamanho do efeito deste fator tenha sido grande ($SE=1,06$). Uma possível explicação para isto, pode ser devido ao tamanho da amostra adotado neste estudo. Outra observação é não ter ocorrido interação entre os fatores, também demonstrado pela análise estatística ($p = 0,131$).

4.3.2 Músculo Extensor Longo dos Dedos

A Tabela 6 apresenta os resultados dos valores médios das expressões das proteínas contráteis no músculo extensor longo dos dedos, de ratos com 90 dias de vida submetidos a desnutrição perinatal e irradiação de corpo inteiro, com dose de 2,5 Gy.

Tabela 6 - Valores médios das quantidades das proteínas contráteis no músculo EDL de ratos com 90 dias após desnutrição perinatal e TBI com dose de 2,5 Gy normalizados por GAPDH.

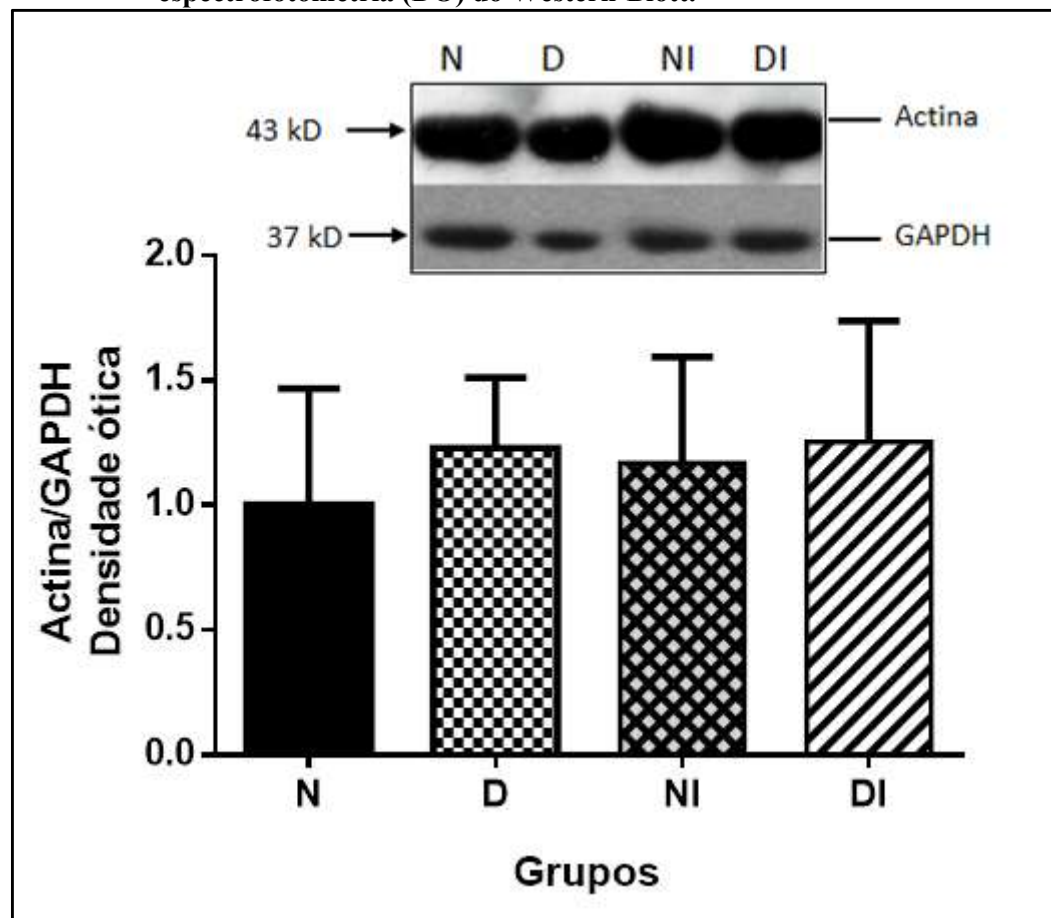
Proteínas	Grupos			
	N	D	NI	DI
Actina	$1,06 \pm 0,20$	$1,30 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,16$	$1,31 \pm 0,18$
Miosina I	$0,71 \pm 0,14$	$1,83 \pm 0,12$	**	**
Miosina IIB	$0,89 \pm 0,25$	$1,47 \pm 0,17$	$2,17 \pm 0,28$	$1,88 \pm 0,23$

Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão obtido a partir dos diferentes grupos experimentais. N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. **.-Não detectada.

4.3.2.1 Análise da expressão da proteína actina

A Figura 16 apresenta a expressão de actina no músculo EDL, nos diferentes grupos experimentais ($N=1,00 \pm 0,47$; $D=1,23 \pm 0,28$; $NI=1,27 \pm 0,43$; $DI=1,24 \pm 0,56$), no 90º dia de vida após desnutrição e irradiação, padronizadas relativamente ao grupo normonutrido, sendo os demais grupos apresentados em números de vezes maior ou menor ao controle.

Figura 16 - Expressão de actina em amostras de músculo EDL de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.



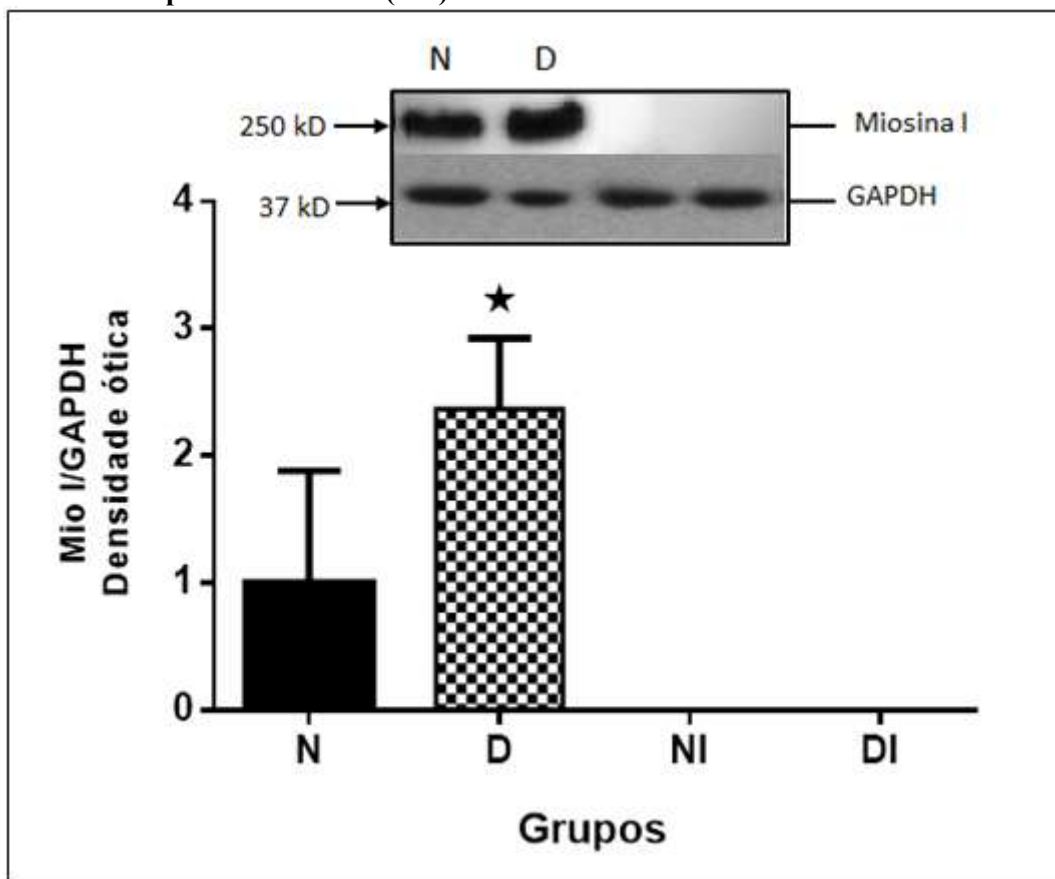
N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de Tukey.

Semelhantemente ao músculo Sóleo, as expressões de actina no músculo EDL não sofreram alterações em seus valores médios ($p = 0,715$), após a desnutrição e a irradiação, o que sugere mais uma vez, que essa proteína não foi sensível aos agentes externos impostos nesta pesquisa, como já constatado em estudos anteriores (BRACH *et al.*, 1991; GUBINA *et al.*, 2010) e neste próprio estudo.

4.3.2.2 Análise da expressão da proteína miosina I

A expressões de miosina I no músculo EDL são apresentadas na Figura 17 ($N=1,00 \pm 0,88$; $D=2,37 \pm 0,56$). Os resultados estão padronizados relativamente ao grupo normonutrido.

Figura 17 - Expressão de miosina I em amostras de músculo EDL de ratos com 90 dias desnutridos e submetidos à TBI (dose de 2,5 Gy) medida por espectrofotometria (DO) do Western-Blott.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. TDE = 2,736. ★ Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N. Os dados foram analisados por teste *t* de Student.

De acordo com Delp e Duran (1996) e Staron (1997), o músculo EDL possui apenas cerca de 4% de fibras tipo I em sua composição, o que o torna, deste modo, um músculo de metabolismo essencialmente glicolítico, devido a presença da MHCIIB na constituição da maioria de suas fibras. Isto é verificado quando observamos a Tabela 6, onde percebe-se claramente que a expressão de miosina I é menor que a de miosina IIB no grupo normonutrido.

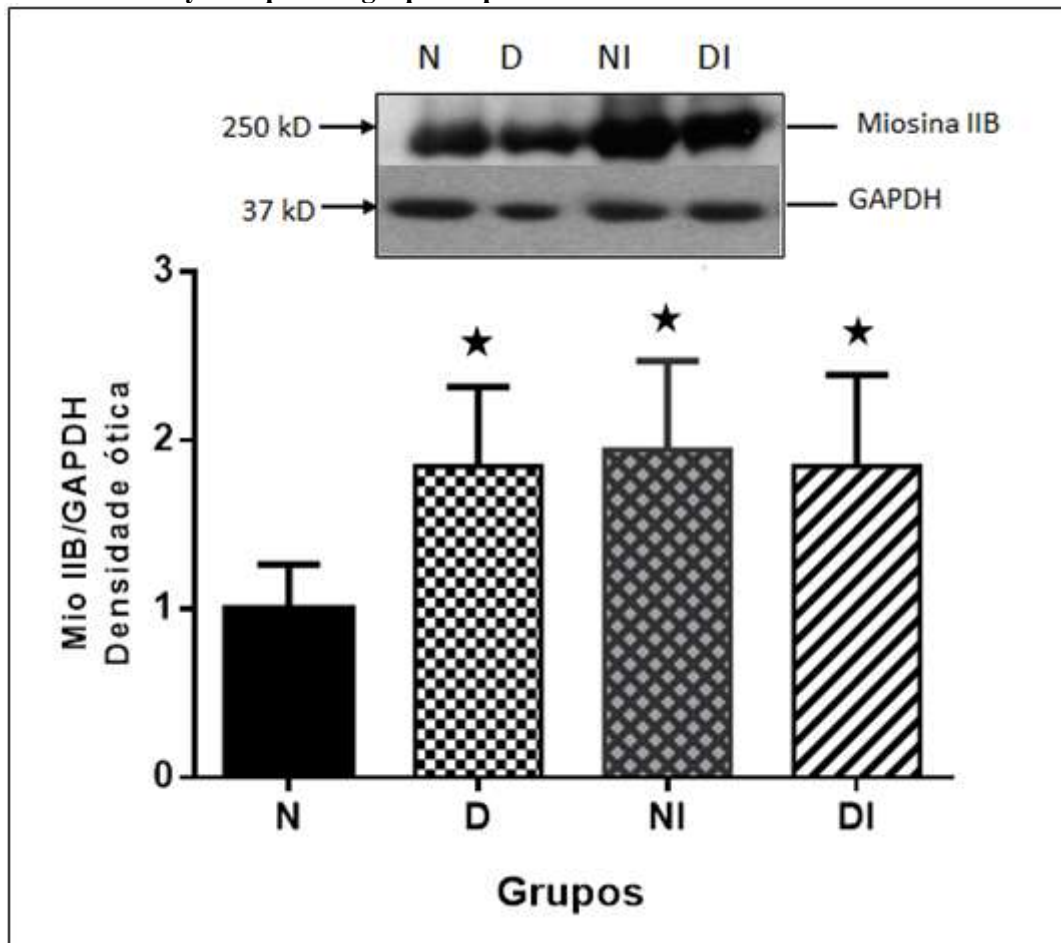
Na Tabela 6, nota-se que não aparecem as expressões de miosina I para os grupos que foram submetidos à radiação, provavelmente em consequência de seus efeitos deletérios, pois em virtude deste músculo apresentar previamente baixas concentrações desta proteína em suas fibras, tornando-se difícil sua determinação. Por outro lado, observando a Figura 17, percebemos que a expressão de miosina I no grupo D, que sofreu apenas desnutrição perinatal, aparece cerca de 2,4 vezes mais em relação ao grupo normonutrido (N), sugerindo, mais uma vez que a desnutrição provoca um aumento na quantidade de miosina I na fibra muscular em

músculos submetidos a este tipo de agressão no início da vida, corroborando com os resultados encontrados referentes ao músculo Sóleo. Tal fator apresenta um tamanho do efeito grande ($SE=2,736$).

4.3.2.3 Análise da expressão da proteína miosina IIB

A Figura 18 apresenta para os quatros grupos experimentais, as expressões de miosina IIB padronizada relativamente ao grupo normonutrido ($N=1,00\pm0,26$; $D=1,85\pm0,47$; $NI=2,18\pm0,53$; $DI=2,08\pm0,54$).

Figura 18 - Densitometria ótica de bandas representando a proteína miosina IIB no músculo EDL de ratos com 90 dias após desnutrição e TBI de 2,5 Gy nos quatros grupos experimentais.



N-grupo normonutrido; D- grupo desnutrido; NI- grupo normonutrido irradiado; DI- grupo desnutrido irradiado. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. ★ Diferença significativa para $p < 0,05$ em relação a N. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de post teste de Tukey.

Na Figura 18, pode-se observar que as expressões de miosina IIB referentes aos grupos que receberam irradiação de corpo inteiro, chega a ser cerca de duas vezes mais quando comparadas ao grupo controle (normonutrido). Isto também foi constatado em relação ao músculo Sóleo no grupo NI, reforçando a hipótese de que a radiação ionizante, em baixas doses, estimula o aumento da expressão da miosina IIB no músculo esquelético. Neste músculo, comparando-se os grupos N e NI, observa-se diferença estatística ($p < 0,0001$), indicando que a TBI promoveu aumento na expressão de miosina IIB. Este fator, apresentou um tamanho do efeito grande ($SE=1,60$), o que reforça os resultados.

Quanto ao efeito da desnutrição, verifica-se que a expressão de miosina IIB no grupo D em relação ao grupo N, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), sugerindo que a desnutrição promoveu o aumento na expressão proteica de miosina IIB. Outros estudos (HOWELLS *et al.*, 1978; ZHU *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2008), usando diferentes protocolos de indução da desnutrição, também encontraram alterações nas proporções de fibras tipo IIB no músculo EDL, corroborando com os resultados do presente estudo. Observou-se também que o tamanho do efeito deste fator foi grande ($SE=1,22$).

Também foi verificado que os fatores irradiação e desnutrição interagiram ($p < 0,0001$), o que indica que um interfere no efeito do outro, neste caso de forma positiva, ambos promovendo o aumento da expressão da miosina IIB no músculo EDL. A interação entre os fatores também apresentou tamanho do efeito grande ($SE=1,64$).

A cadeia pesada de miosina (MHC) é uma importante proteína miofibrilar, que determina em grande parte a taxa de desenvolvimento da força e a velocidade máxima de encurtamento da formação de pontes cruzadas (MARTINS *et al.*, 2009). Evidências mostram que existe correlação entre a velocidade máxima de encurtamento e a composição da cadeia pesada de miosina. Geralmente, maiores velocidades de encurtamento estão associadas a maiores quantidades de cadeias pesadas rápidas, ao passo que o aumento das quantidades da cadeia pesada lenta correlaciona-se com velocidades de encurtamento mais lentas. Portanto, um contínuo de velocidades contráteis correlacionam-se com um contínuo de composições de cadeia pesada de miosina (PETTE e STARON, 1990), entretanto, músculos com predomínio de MHC I apresentam alta resistência à fadiga, enquanto que o predomínio de MHC II representa baixa resistência (MINAMOTO, 2005).

Por outro lado, os músculos esqueléticos têm uma notável capacidade de alterações adaptativas em resposta ao uso e desuso, incluindo alterações no tamanho da fibra (por exemplo, hipertrofia muscular) e tipo de fibra (por exemplo, mudança de tipo de fibra rápida para lenta)

e mudanças correlacionadas à força muscular e resistência à fadiga (PETTE e STARON, 1997). Tais alterações são induzidas por fatores como: padrões de atividade nervosa; carga mecânica e fatores circulantes, incluindo diferentes hormônios, que afetam a composição do tipo de fibra muscular (SCHIAFFINO e REGGIANI, 2011). Estas transições fenotípicas incluem alterações nos perfis de isoformas de múltiplas proteínas sarcoméricas e, assim, representam alterações orquestradas na expressão gênica. A troca de isoformas de proteínas, ou alterações nas quantidades de proteínas específicas, são controladas por transcrição, tradução e degradação de proteínas (PETTE e STARON, 2000).

As células satélites, quando ativadas, expressam vários fatores transcricionais, entre eles, os fatores reguladores miogênicos MyoD, Myf5, miogenina e MRF4, que controlam a proliferação e a diferenciação celular (HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005). A supressão da proliferação dessas células no músculo por irradiação impede a hipertrofia sem, no entanto, afetar as adaptações na expressão de genes da MHC (PETTE e STARON, 1997; PHELAN e GONYEA, 1997; CAIOZZO *et al.*, 2010).

Os resultados dos efeitos a longo prazo, dos tratamentos aplicados neste estudo são apresentados resumidamente na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeitos aos 90 dias dos tratamentos aplicados neste estudo

Variável	Tratamento		
	Desnutrição	TBI	Desnutrição+TBI
Massa corporal	↓	↓	—
Proteínas Totais	—	↓	—
Albumina	—	↓	—
Actina	—	—	—
Miosina I	↑	—	—
Miosina IIB	↑ *	↑	↑

↑ - Aumento; ↓ - Redução; — Sem alteração ; * Apenas no EDL

Devem ser consideradas as diferenças anatômicas, fisiológicas, e do desenvolvimento quando são analisados os resultados de pesquisas em ratos em que a idade é um fator crucial. Isto porque usar a maturidade musculoesquelética para determinar a idade em ratos e correlacionar com o humano é problemático porque, ao contrário dos seres humanos, não há fechamento epifisário em ossos longos no rato (ANDREOLLO *et al.*, 2012). Para isso, atenção

especial é necessária a fim de verificar a fase em dias do animal e sua correlação com os anos em humanos, deste modo, considera-se que, em relação a maturidade musculoesquelética, 10,5 dias de vida do rato equivalem a 1 ano de vida do humano (QUINN, 2005).

Este estudo favorece um melhor conhecimento da relação entre desnutrição e radioterapia, que pode levar a mudanças importantes nas estratégias de dosagem e concepção de novos protocolos de acompanhamento, tais como avaliações periódicas das concentrações proteicas séricas e avaliações neuromotoras, para crianças e jovens saudáveis ou desnutridos que receberam TBI, embora haja a necessidade da realização de experimentos complementares para a extrapolação para humanos.

Pacientes que receberam TBI na infância apresentam risco de desenvolver complicações a longo prazo, tais como endocrinopatias, comprometimento cardiopulmonar, renal, gastrointestinal, dental, ocular, cognitivo e distúrbios musculoesqueléticos, bem como tumores secundários. Apesar disso, há relativamente poucos estudos que relatam especificamente os efeitos tardios do TBI sobre as crianças (BHATIA, 2011; MULCAHY LEVY *et al.*, 2013). Todas essas complicações têm um impacto direto sobre a morbidade e mortalidade dos pacientes, em geral dois terços desenvolvem pelo menos uma doença crônica, enquanto um quinto desenvolve condições graves ou fatais (BHATIA, 2011).

Os distúrbios musculoesqueléticos são predominantes e persistem entre os pacientes. Syrjala e colaboradores (2005) relataram que 35% dos pacientes que foram tratados com o transplante na infância e que tinham sobrevivido durante 10 anos ou mais, apresentaram um ou mais distúrbios musculoesqueléticos, em comparação com 17% dos controles pareados.

Pacientes que recebem transplante apresentam uma expectativa de vida estimada de 30% menor em comparação com a população em geral. Essa alta taxa de morbidade experimentada pelos pacientes torna criticamente importante que haja um acompanhamento padronizado (BHATIA, 2011).

O “Center for International Blood and Marrow Transplant Research”, o “European Group for Blood and Marrow Transplantation”, a “American Society for Blood and Marrow Transplantation” e o “Children’s Oncology Group” desenvolveram recomendações para oferecer cuidados e práticas de monitoramento e prevenção dos pacientes que receberam transplantes autólogos e alogênicos (FIGURA 19). As orientações propostas concentram-se em riscos enfrentados por crianças e adultos que sobreviveram 6 meses ou mais após o transplante autólogo e alogênico. A maioria delas são derivadas de estudos que identificaram complicações específicas em pacientes a longo prazo e os fatores de risco associados a eles (BHATIA, 2011).

Para garantir a aplicabilidade internacional, o grupo de trabalho incluiu os seguintes participantes:

- Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group (APBMT),
- Bone Marrow Transplant Society of Australia and New Zealand (BMTSANZ),
- East Mediterranean Blood and Marrow Transplantation Group (EMBM) e a
- Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO).

Figura 19 - Monitoramentos recomendados e práticas preventivas para sobreviventes após o transplante hematopoiético celular a longo prazo

Monitoramento recomendado	Prevenção	6m	1a	Anual
Imunidade	▪ Profilaxia contra organismo encapsulado	●	●	●
	▪ Profilaxia contra pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> .	●	●	
	▪ Testes de citomegalovírus	●	●	●
	▪ Imunizações	+	+	+
Ocular	▪ Avaliação clínica dos sintomas oculares	+	+	+
	▪ Exame de fundo de olho	▲	+	▲
Complicações orais	▪ Avaliação clínica	+	+	+
	▪ Avaliação odontológica	▲	+	+
Respiratório	▪ Avaliação clínica pulmonar	+	+	+
	▪ Evitar fumar	+	+	+
	▪ Teste de função pulmonar	▲	▲	▲
	▪ Radiografia de tórax	▲	▲	▲
Cardíaco e vascular	▪ Avaliação dos fatores de risco cardiovascular	▲	+	+
Fígado	▪ Testes de função hepática	+	+	▲
	▪ Testes de ferritina sérica		+	▲
Rim	▪ Rastreio da pressão sanguínea	+	+	+
	▪ Rastreio de proteínas na urina	+	+	+
	▪ Testes Ureia / creatinina	+	+	+
Músculo e tecido conjuntivo	▪ Avaliação da fraqueza muscular	●	●	●
	▪ Orientação sobre atividade física	+	+	+
Esqueleto	▪ Avaliação da densidade óssea		+	▲
Sistema nervoso	▪ Avaliação clínica neurológica	▲	+	+
	▪ Avaliar o desenvolvimento cognitivo		+	+
Endócrino	▪ Testes de função da tireóide		+	+
	▪ Acompanhamento do crescimento em crianças		+	+
	▪ Avaliação da função gonadal	+	+	+
Muco-cutânea	▪ Autoexame da Pele e aconselhamento à exposição solar	+	+	+
	▪ Exame ginecológico	▲	+	+
Câncer secundário	▪ Aconselhamento e vigilância a câncer secundário		+	+
	▪ Rastreio de câncer secundário		+	+
Psicossocial	▪ Psicossocial / avaliação clínica da qualidade de vida	+	+	+
	▪ Avaliação da função sexual	+	+	+

+ Recomendado para todos os pacientes transplantados.

● Recomendado para qualquer paciente com Doença do enxerto contra hospedeiro crônica em curso ou imunossupressão.

▲ Reavaliação recomendado para teste alterado em um período de tempo anterior ou para os novos sinais / sintomas.

Analisando o conjunto de recomendações propostas, verifica-se que os parâmetros investigados neste estudo não estão incluídos no rol das ações sugeridas. Deste modo, este

estudo vem contribuir para o enriquecimento destas recomendações, especialmente para o acompanhamento e monitoramento de crianças submetidas a TBI e fortalecer a necessidade de acompanhamento das concentrações séricas de proteínas totais e albumina como também testes e avaliações do desempenho muscular.

5. CONCLUSÕES

1. A redução no ganho de massa corporal a longo prazo foi confirmada como efeito da desnutrição perinatal.
2. A TBI com dose de 2,5 Gy durante a infância provoca redução no ganho de massa corporal a longo prazo.
3. A desnutrição perinatal não influencia as concentrações séricas de proteínas totais e albumina a longo prazo.
4. A TBI com dose de 2,5 Gy durante a infância diminui as concentrações séricas de proteínas totais e albumina a longo prazo.
5. A desnutrição perinatal não influencia na expressão de actina do músculo esquelético a longo prazo.
6. A TBI com dose de 2,5 Gy durante a infância não altera a expressão de actina do músculo esquelético a longo prazo.
7. A desnutrição perinatal promove aumento na expressão de miosina I do músculo esquelético a longo prazo.
8. A TBI com dose de 2,5 Gy durante a infância não altera a expressão de miosina I do músculo esquelético a longo prazo.
9. A desnutrição perinatal aumenta a expressão de miosina IIB no músculo EDL e não promove alteração no músculo Sóleo a longo prazo.
10. A TBI com dose de 2,5 Gy durante a infância promove aumento na expressão de miosina IIB do músculo esquelético a longo prazo.

Embora sejam necessários estudos posteriores com diferentes doses e acompanhamentos em idades distintas, neste trabalho pôde-se constatar que tanto a desnutrição como procedimentos de irradiação de corpo inteiro em ratos jovens apresentam repercussões a longo prazo, mesmo em doses abaixo das utilizadas convencionalmente para TBI.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados desta pesquisa reforçam a necessidade de um acompanhamento mais detalhado de crianças e jovens irradiados na infância, seja para exames de diagnósticos ou no condicionamento do transplante de medula óssea, sendo necessário uma maior atenção para recuperação integral da saúde, no sentido de prevenir condições patológicas na idade adulta originadas no início da vida.

Estudos futuros com crianças submetidas a TBI, com base nos mesmos indicadores moleculares investigados nesta pesquisa, poderão confirmar a importância da utilização desses indicadores moleculares no acompanhamento do estado geral de saúde de pacientes submetidos a esse tipo de tratamento por meio da coleta de amostras de sangue periférico e avaliações das capacidades motoras.

REFERÊNCIAS

1. AGBULUT, O.; NOIREZ, P.; BEAUMONT, F.; BUTLER-BROWNE, G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. **Biol Cell**, v. 95, n. 6, p. 399-406, Sep 2003. ISSN 0248-4900 (Print) 0248-4900 (Linking).
2. AHLERSOVA, E.; AHLERS, I.; SLAVKOVSKA, E.; PRASLICKA, M. Metabolic changes after non-lethal x-irradiation of rats. I. Carbohydrates, hormones. **Folia Biol (Praha)**, v. 27, n. 6, p. 404-412, 1981. ISSN 0015-5500 (Print) 0015-5500 (Linking).
3. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584. p
4. ALHEIROS-LIRA, M. C.; ARAUJO, L. L.; TRINDADE, N. G.; DA SILVA, E. M.; CAVALCANTE, T. C.; DE SANTANA MUNIZ, G.; NASCIMENTO, E.; LEANDRO, C. G. Short- and long-term effects of a maternal low-energy diet ad libitum during gestation and/or lactation on physiological parameters of mothers and male offspring. **Eur J Nutr**, v. 54, n. 5, p. 793-802, Aug 2015. ISSN 1436-6215 (Electronic) 1436-6207 (Linking).
5. ALMEIDA, AP; CELESTINO, JJH; SARAIVA, MVA; SILVA, JRV; FIGUEIREDO, JR Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 133-148, jul/set 2010.
6. ALVES, A. P.; DAMASO, 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 (Rio J)**, v. 84, n. 3, p. 264-71, May-Jun 2008. ISSN 0021-7557 (Print) 0021-7557 (Linking).

7. ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAUJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49-51, Jan-Mar 2012. ISSN 0102-6720
8. AUGUSTINE, A. D.; GONDRE-LEWIS, T.; MCBRIDE, W.; MILLER, L.; PELLMAR, T. C.; ROCKWELL, S. Animal models for radiation injury, protection and therapy. **Radiat Res**, v. 164, n. 1, p. 100-9, Jul 2005. ISSN 0033-7587 (Print) 0033-7587 (Linking).
9. AZEVEDO, A. C. P. **Radioproteção em Serviços de Saúde**. Rio de Janeiro: 2009. 30. p
10. BAILEY, P.; HOLOWACZ, T.; LASSAR, A. B. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 679-89, Dec 2001. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking).
11. BANDSTRA, E. R.; THOMPSON, R. W.; NELSON, G. A.; WILLEY, J. S.; JUDEX, S.; CAIRNS, M. A.; BENTON, E. R.; VAZQUEZ, M. E.; CARSON, J. A.; BATEMAN, T. A. Musculoskeletal changes in mice from 20-50 cGy of simulated galactic cosmic rays. **Radiat Res**, v. 172, n. 1, p. 21-29, Jul 2009. ISSN 0033-7587
12. BAYOL, STEPHANIE; JONES, DOIRAN; GOLDSPINK, GEOFFREY; STICKLAND, NEIL 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**, v. 91, n. 03, p. 331-339, 2004. ISSN 1475-2662.
13. BEDI, KS; BIRZGALIS, AR; MAHON, M; SMART, JL; WAREHAM, AC Early life undernutrition in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 47, n. 03, p. 417-431, 1982. ISSN 1475-2662.
14. BENTO-SANTOS, A.; SANTOS, J. A.; SILVA, A. I.; NOVAES, L. C. M. G.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; SOUZA, S. L.; LEANDRO, C. V. G.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **RESBCAL**, v. 1, n. 1, p. 121-129, jan 2012.
15. BERNARD, C. Claude Bernard: "an Introduction to the Study of Experimental Medicine. **Med J Aust**, v. 1, n. 4, p. 119-20, Jan 23 1965. ISSN 0025-729X (Print) 0025-729X (Linking).
16. BHATIA, S. Long-term health impacts of hematopoietic stem cell transplantation inform recommendations for follow-up. **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 4, p. 437-52; quiz 453-4, Aug 2011. ISSN 1747-4094 (Electronic) 1747-4094 (Linking).
17. BOFF, SÉRGIO RICARDO A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. **Acta fisiátrica**, v. 15, n. 2, p. 111-116, 2008. ISSN 0104-7795.
18. BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 73, n. 2-4, p. 195-262, 2000. ISSN 0079-6107 (Print) 0079-6107 (Linking).

19. BRACH, M. A.; HASS, R.; SHERMAN, M. L.; GUNJI, H.; WEICHSELBAUM, R.; KUFE, D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. **J Clin Invest**, v. 88, n. 2, p. 691-5, Aug 1991. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).
20. BRAMELD, J. M. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. **Br J Nutr**, v. 91, n. 3, p. 327-8, Mar 2004. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145 (Linking).
21. BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 001, de 14 de junho de 1988, Pesquisa com isótopos radioativos Dispositivos e Geradores de radiações ionizantes e eletromagnéticas, **Diário Oficial da União**, Brasília, 1988. 10.713 -10.718 p.
22. BROOKE, MICHAEL H; KAISER, KENNETH K Three" myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 18, n. 9, p. 670-672, 1970. ISSN 0022-1554.
23. BROWN, K. R.; RZUCIDLO, E. Acute and chronic radiation injury. **J Vasc Surg**, v. 53, n. 1 Suppl, p. 15S-21S, Jan 2011. ISSN 1097-6809 (Electronic) 0741-5214 (Linking).
24. BRUNELLO, E.; BIANCO, P.; PIAZZESI, G.; LINARI, M.; RECONDITI, M.; PANINE, P.; NARAYANAN, T.; HELSBY, W. I.; IRVING, M.; LOMBARDI, V. Structural changes in the myosin filament and cross-bridges during active force development in single intact frog muscle fibres: stiffness and X-ray diffraction measurements. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 971-84, Dec 15 2006. ISSN 0022-3751 (Print).
25. BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. **Curr Opin Genet Dev**, v. 11, n. 4, p. 440-8, Aug 2001. ISSN 0959-437X (Print) 0959-437X (Linking).
26. BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J Anat**, v. 202, n. 1, p. 59-68, Jan 2003. ISSN 0021-8782 (Print).
27. BULLER, AJ; ECCLES, JC; ECCLES, ROSAMOND M Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. **The Journal of physiology**, v. 150, n. 2, p. 417, 1960.
28. BUSCHER, D.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. **Cell Tissue Res**, v. 296, n. 1, p. 131-9, Apr 1999. ISSN 0302-766X (Print).
29. CAIOZZO, V. J.; GIEDZINSKI, E.; BAKER, M.; SUAREZ, T.; IZADI, A.; LAN, M.; CHO-LIM, J.; TSENG, B. P.; LIMOLI, C. L. The radiosensitivity of satellite cells: cell cycle regulation, apoptosis and oxidative stress. **Radiat Res**, v. 174, n. 5, p. 582-589, Nov 2010. ISSN 1938-5404 (Electronic) 0033-7587 (Linking).

30. CASTRO JR, CLÁUDIO GALVÃO DE; GREGIANIN, LAURO JOSÉ; BRUNETTO, ALGEMIR LUNARDI Bone marrow transplantation and cord blood transplantation in children. **Jornal de pediatria**, v. 77, n. 5, p. 345-360, 2001. ISSN 0021-7557.
31. CHEN, P. Y.; GANGULY, A.; RUBBI, L.; OROZCO, L. D.; MORSELLI, M.; ASHRAF, D.; JAROSZEWICZ, A.; FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; NAKANO, A.; DEVASKAR, S. U.; PELLEGRINI, M. Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression. **Physiol Genomics**, v. 45, n. 14, p. 565-76, Jul 15 2013. ISSN 1531-2267 (Electronic) 1094-8341 (Linking).
32. CHO-LIM, J. J.; CAIOZZO, V. J.; TSENG, B. P.; GIEDZINSKI, E.; BAKER, M. J.; LIMOLI, C. L. Satellite cells say NO to radiation. **Radiat Res**, v. 175, n. 5, p. 561-568, May 2011. ISSN 1938-5404 (Electronic) 0033-7587 (Linking).
33. CRAWFORD, K.; FLICK, R.; CLOSE, L.; SHELLY, D.; PAUL, R.; BOVE, K.; KUMAR, A.; LESSARD, J. Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 16, p. 5887-96, Aug 2002. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).
34. DA CUNHA VASCONCELOS, FLAVIA Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 191-202, 2004.
35. DA SILVA ARAGAO, R.; GUZMAN-QUEVEDO, O.; PEREZ-GARCIA, G.; TOSCANO, A. E.; GOIS LEANDRO, C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; BOLANOS-JIMENEZ, F. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 1, p. 70-83, Jan 2013. ISSN 1748-1716 (Electronic) 1748-1708 (Linking).
36. DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; DE OLIVEIRA, G. B.; DA SILVA, G. S.; WANDERLEY, A. G.; LEANDRO, C. G.; COSTA-SILVA, J. H. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking).
37. DE OLIVEIRA, E.; DE CAMPOS, T.T.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, D. B. Eletroforese: Conceitos e aplicações. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 11, n. 22, p. 1129-1149, dez 2015.
38. DE SANTANA MUNIZ, G.; DA SILVA, A. M.; CAVALCANTE, T. C.; DA SILVA FRANCA, A. K.; FERRAZ, K. M.; DO NASCIMENTO, E. Early physical activity minimizes the adverse effects of a low-energy diet on growth and development parameters. **Nutr Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 113-24, May 2013. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking).
39. DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 80, n. 1, p. 261-70, Jan 1996. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking).

40. DUBOWITZ, V; PEARSE, AG EVERSON A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 105-117, 1960. ISSN 0948-6143.
41. DWYER, C. M.; MADGWICK, A. J.; WARD, S. S.; STICKLAND, N. C. Effect of maternal undernutrition in early gestation on the development of fetal myofibres in the guinea-pig. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, n. 5, p. 1285-92, 1995. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking).
42. DWYER, C. M.; STICKLAND, N. C.; FLETCHER, J. M. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. **J Anim Sci**, v. 72, n. 4, p. 911-7, Apr 1994. ISSN 0021-8812 (Print) 0021-8812 (Linking).
43. FAGUNDES, DJALMA JOSÉ; TAHA, MURCHED OMAR Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.
44. 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**, v. 83, n. 11, p. 2564-71, Nov 2005. ISSN 1525-3163 (Electronic) 0021-8812 (Linking).
45. FALCÃO-TEBAS, FILIPPE; TOBIAS, AMANDA THEREZA; BENTO-SANTOS, ADRIANO; SANTOS, JOSÉ ANTÔNIO DOS; VASCONCELOS, DIOGO ANTÔNIO ALVES DE; FIDALGO, MARCO ANTÔNIO; MANHÃES-DE-CASTRO, RAUL; LEANDRO, CAROL GÓIS Effects of physical training during pregnancy on body weight gain, blood glucose and cholesterol in adult rats submitted to perinatal undernutrition. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2012. ISSN 1517-8692.
46. FERRO CAVALCANTE, T. C.; MARCELINO DA SILVA, A. A.; AMARAL ALMEIDA, L. C.; TAVARES, G. A.; DE FARIAS CAMPINA, R. C.; DO NASCIMENTO, E.; LOPES DE SOUZA, S. Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rats. **Physiol Behav**, v. 165, p. 35-42, Jun 27 2016. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).
47. FONTOURA, C. S. M.; CRUZ, D. O.; LONDERO, L. G.; VIEIRA, R. M. Avaliação Nutricional de Paciente Critico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 3, 2006.
48. FOX, J. B., JR.; LAKRITZ, L.; THAYER, D. W. Effect of reductant level in skeletal muscle and liver on the rate of loss of thiamin due to gamma-radiation. **Int J Radiat Biol**, v. 64, n. 3, p. 305-309, Sep 1993. ISSN 0955-3002
49. GASSMANN, M.; GRENACHER, B.; ROHDE, B.; VOGEL, J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**, v. 30, n. 11, p. 1845-55, Jun 2009. ISSN 1522-2683 (Electronic) 0173-0835 (Linking).

50. GERSTNER, H. B.; LEWIS, R. B.; RICHEY, E. O. Early effects of high intensity x-radiation on skeletal muscle. **J Gen Physiol**, v. 37, n. 4, p. 445-459, Mar 1953. ISSN 0022-1295 (Print) 0022-1295 (Linking).
51. GILLETTE, E. L.; MAHLER, P. A.; POWERS, B. E.; GILLETTE, S. M.; VUJASKOVIC, Z. Late radiation injury to muscle and peripheral nerves. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 31, n. 5, p. 1309-1318, Mar 30 1995. ISSN 0360-3016
52. GIORDANI, ADELMO JOSÉ; SEGRETO, HELENA REGINA COMODO; SEGRETO, ROBERTO ARAÚJO; MEDEIROS, REGINA BITELLI; OLIVEIRA, JOSÉ SALVADOR R. DE Verificação das doses de radiação absorvidas durante a técnica de irradiação de corpo inteiro nos transplantes de medula óssea, por meio de dosímetros termoluminescentes. **Radiologia Brasileira**, v. 37, p. 343-349, 2004. ISSN 0100-3984.
53. GOLLNICK, P. D.; SJODIN, B.; KARLSSON, J.; JANSSON, E.; SALTIN, B. Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. **Pflugers Arch**, v. 348, n. 3, p. 247-55, Apr 22 1974. ISSN 0031-6768 (Print) 0031-6768 (Linking).
54. GONZÁLEZ, FÉLIX HD; SCHEFFER, JEAN FS. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, Gramado. Anais, Porto Alegre, 2002. p.5-17.
55. GORI, T.; MUNZEL, T. Biological effects of low-dose radiation: of harm and hormesis. **Eur Heart J**, v. 33, n. 3, p. 292-5, Feb 2012. ISSN 1522-9645 (Electronic) 0195-668X (Linking).
56. GORNALL, ALLAN G; BARDAWILL, CHARLES J; DAVID, MAXIMA M Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of biological chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
57. GRANATA, A. L.; VECCHI, C.; GRACIOTTI, L.; FULGENZI, G.; MAGGI, S.; CORSI, A. Gamma irradiation can reduce muscle damage in mdx dystrophic mice. **Acta Neuropathol**, v. 96, n. 6, p. 564-568, Dec 1998. ISSN 0001-6322
58. GUBINA, NE; MEREKINA, OS; USHAKOVA, TE Mitochondrial DNA transcription in mouse liver, skeletal muscle, and brain following lethal X-ray irradiation. **Biochemistry**, 2010. ISSN 0006-2979.
59. HALL, ERIC J. **Radiobiology for the Radiologist** 4th. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1994. 478. p
60. HAMILL, J.; KNUTZEN, K.M. **Bases biomecânicas do movimento humano**. 2ed. Barueri, SP: Manole, 2008. 494. p

61. HEIDEBRECHT, F.; HEIDEBRECHT, A.; SCHULZ, I.; BEHRENS, S. E.; BADER, A. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. **J Immunol Methods**, v. 345, n. 1-2, p. 40-8, Jun 30 2009. ISSN 1872-7905 (Electronic) 0022-1759 (Linking).
62. HILBER, KARLHEINZ; GALLER, STEFAN; GOHLSCH, BÄRBEL; PETTE, DIRK Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. **FEBS letters**, v. 455, n. 3, p. 267-270, 1999. ISSN 0014-5793.
63. HINO, M.; HAMADA, N.; TAJIKA, Y.; FUNAYAMA, T.; MORIMURA, Y.; SAKASHITA, T.; YOKOTA, Y.; FUKAMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; YORIFUJI, H. Insufficient membrane fusion in dysferlin-deficient muscle fibers after heavy-ion irradiation. **Cell Struct Funct**, v. 34, n. 1, p. 11-15, 2009. ISSN 1347-3700 (Electronic) 0386-7196 (Linking).
64. HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Semin Cell Dev Biol**, v. 16, n. 4-5, p. 575-84, Aug-Oct 2005. ISSN 1084-9521 (Print) 1084-9521 (Linking).
65. HOROWITS, R.; KEMPNER, E. S.; BISHOP, M. E.; PODOLSKY, R. J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. **Nature**, v. 323, n. 6084, p. 160-164, Sep 11-17 1986. ISSN 0028-0836
66. HOWELLS, K. F.; MATHEWS, D. R.; JORDAN, T. C. Effects of pre and perinatal malnutrition on muscle fibres from fast and slow rat muscles. **Res Exp Med (Berl)**, v. 173, n. 1, p. 35-40, Jul 24 1978. ISSN 0300-9130 (Print) 0300-9130 (Linking).
67. HSU, H. Y.; CHAI, C. Y.; LEE, M. S. Radiation-induced muscle damage in rats after fractionated high-dose irradiation. **Radiat Res**, v. 149, n. 5, p. 482-486, May 1998. ISSN 0033-7587 (Print) 0033-7587 (Linking).
68. HUANG, LIN; WICKRAMASEKARA, SAMANTHI I; AKINYEKE, TUNDE; STEWART, BLAIR S; JIANG, YUAN; RABER, JACOB; MAIER, CLAUDIA S Ion mobility-enhanced MS E-based label-free analysis reveals effects of low-dose radiation post contextual fear conditioning training on the mouse hippocampal proteome. **Journal of proteomics**, v. 140, p. 24-36, 2016. ISSN 1874-3919.
69. HUXLEY, A. F.; NIEDERGERKE, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. **Nature**, v. 173, n. 4412, p. 971-3, May 22 1954. ISSN 0028-0836 (Print).
70. HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, n. 3886, p. 1356-65, Jun 20 1969. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
71. HUXLEY, H.; HANSON, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature**, v. 173, n. 4412, p. 973-6, May 22 1954. ISSN 0028-0836 (Print).

72. IAEA. **Radiation Biology: A handbook for teachers and students training course**. Vienna: 2010. 166. p ISSN 1018-5518.

73. JARTTI, PIRKKO; PUKKALA, EERO; UTTI, JUKKA; AUVINEN, ANSSI Cancer incidence among physicians occupationally exposed to ionizing radiation in Finland. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 368-373, 2006. ISSN 0355-3140.

74. JURDANA, M. Radiation effects on skeletal muscle. **Radiol Oncol**, v. 42, n. 1, p. 15-22, 2008.

75. JURDANA, M.; CEMAZAR, M.; PEGAN, K.; MARS, T. Effect of ionizing radiation on human skeletal muscle precursor cells. **Radiol Oncol**, v. 47, n. 4, p. 376-381, 2013. ISSN 1318-2099 (Print) 1318-2099 (Linking).

76. KANHERKAR, R. R.; BHATIA-DEY, N.; CSOKA, A. B. Epigenetics across the human lifespan. **Front Cell Dev Biol**, v. 2, p. 49, 2014. ISSN 2296-634X (Electronic) 2296-634X (Linking).

77. KHAN, M. Y. Radiation-induced changes in skeletal muscle. An electron microscopic study. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 33, n. 1, p. 42-57, Jan 1974. ISSN 0022-3069 (Print) 0022-3069 (Linking).

78. KHIZHNIK, S. V.; VOITSITSKII, V. M.; KUCHERENKO, N. E. [Structural changes in the sarcoplasmic reticulum membrane of skeletal muscles at the early stage of x-ray irradiation]. **Ukr Biokhim Zh**, v. 63, n. 3, p. 113-7, May-Jun 1991. ISSN 0201-8470

79. KHIZHNIK, S. V.; VOITSITSKII, V. M.; OSTAPCHENKO, S. G.; KUCHERENKO, N. E. [The effect of ionizing radiation on Ca²⁺-ATPase activity from the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscles]. **Ukr Biokhim Zh**, v. 62, n. 2, p. 58-63, Mar-Apr 1990. ISSN 0201-8470

80. . Proteínas Totais Instruções de uso. **Reagentes**, Minas Gerais, p. Ref 99, 2014. Disponível em: < <http://www.labtest.com.br/reagentes#> >.

81. LATORRACA, MÁRCIA QUEIROZ; GOBATO, CLÁUDIO ALEXANDRE; SILVA, ROZINALDO GALDINO DA; SIBUIA, CLARICE YOSHICO; CARNEIRO, EVERARDO MAGALHÃES; MELLO, MARIA ALICE ROSTOM DE Descrição de dieta purificada para indução de quadro de desnutrição protéica em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 4, p. 9-12, 1998. ISSN 1517-8692.

82. LEE, VWK; DE KRETZER, DM; HUDSON, B; WANG, C Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, n. 1, p. 121-126, 1975. ISSN 1470-1626.

83. LEFAIX, J. L.; DABURON, F.; MARTIN, M.; REMY, J. [Gamma irradiation and delayed effects: muscular fibrosis]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 38, n. 6, p. 617-625, Jun 1990. ISSN 0369-8114
84. LEFAIX, J. L.; MARTIN, M.; TRICAUD, Y.; DABURON, F. Muscular fibrosis induced after pig skin irradiation with single doses of ¹⁹²Ir gamma-rays. **Br J Radiol**, v. 66, n. 786, p. 537-544, Jun 1993. ISSN 0007-1285
85. LITTEN, R. Z.; WALDEN, T. L.; GAINNEY, G. T.; NAGAI, R. Alteration of cardiac myosin isozymes after whole-body irradiation. **Br J Radiol**, v. 62, n. 734, p. 189-91, Feb 1989. ISSN 0007-1285 (Print) 0007-1285 (Linking).
86. LOPES DE SOUZA, S.; OROZCO-SOLIS, R.; GRIT, I.; MANHAES DE CASTRO, R.; BOLANOS-JIMENEZ, F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, Mar 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking).
87. LOUREIRO, LUÍS MANUEL DE JESUS; GAMEIRO, MANUEL GONÇALVES HENRIQUES Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística. **Revista de Enfermagem Referência**, n. 3, p. 151-162, 2011. ISSN 0874-0283.
88. LOWEY, S.; SLAYTER, H. S.; WEEDS, A. G.; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **J Mol Biol**, v. 42, n. 1, p. 1-29, May 28 1969. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).
89. LUCKEY, T.D. Biological Effects of Ionizing Radiation. **Journal of american physicians and surgeons**, v. 16, n. 2, p. 45-46, 2011.
90. MARTINS, KAREN JB; MURDOCH, GORDON K; SHU, YANG; HARRIS, R LUKE W; GALLO, MARIA; DIXON, WALTER T; FOXCROFT, GEORGE R; GORDON, TESSA; PUTMAN, CHARLES T Satellite cell ablation attenuates short-term fast-to-slow fibre type transformations in rat fast-twitch skeletal muscle. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 2, p. 325-335, 2009. ISSN 0031-6768.
91. MCDONALD, A. A.; KUNZ, M. D.; MCLOON, L. K. Dystrophic changes in extraocular muscles after gamma irradiation in mdx:utrophin(+/-) mice. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86424, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).
92. MCLEAN, A. C. DENSITOMETRY OF WESTERN BLOTS USING IMAGE J SOFTWARE, Ottawa, Disponível em:< <https://fisionutricioninn.wordpress.com/western-blot/>>. Acesso em: 28/07/2016
93. MELLO, E. D. O que significa a avaliação do estado nutricional. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 5, p. 357-8, 2002.

94. MENDONÇA, BRUNO BRENER; DOS SANTOS, MISLANY KÊNIA FERREIRA; DA SILVA, IZABEL CRISTINA RODRIGUES Os eventos biológicos, especialmente os mecanismos epigenéticos, são alterados pela exposição do indivíduo a radiação ionizante. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 2, p. 50-67, 2013.
95. MESQUITA, I. C. **Lesão Muscular Induzida por Bupivacaína em Linhagem de Camundongos Predisposto a Perfil Distinto de Citocinas**. 2007. 102. p (Dissertação de mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niteroi RJ.
96. MESSINA, G.; COSSU, G. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. **Genes Dev**, v. 23, n. 8, p. 902-905, Apr 15 2009. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking).
97. MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B.; ARAÚJO, E. G. Western Blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1704-1719, 2012.
98. MINAMOTO, VIVIANE BALISARDO Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 50-55, 2005. ISSN 2316-9117.
99. MORAES, C.S.; JUNIOR, F.O.R.O.; MASSON, G.; REBELLO, K.M.; SANTOS, L.O.; BASTOS, N.F.P.; FARIA, R.C. Série em biologia celular e molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas. **Fundação Oswaldo Cruz–Fiocruz, Rio de Janeiro**, 2013.
100. MOULDER, JOHN E; FISH, BRIAN L; COHEN, ERIC P Impact of angiotensin II type 2 receptor blockade on experimental radiation nephropathy. **Radiation research**, v. 161, n. 3, p. 312-317, 2004. ISSN 0033-7587.
101. MUCERINO, D. R.; WAITZBERG, D. L.; DE CAMPOS, F. G.; AURICCHIO, M. T.; GAMA-RODRIGUES, J. J.; LIMA-GONCALVES, E. [Nutritional and energy metabolism changes in abdominal irradiation--experimental study]. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 67-75, Jan-Feb 1995. ISSN 0041-8781 (Print) 0041-8781 (Linking).
102. MULCAHY LEVY, J. M.; TELLO, T.; GILLER, R.; WILKENING, G.; QUINONES, R.; KEATING, A. K.; LIU, A. K. Late effects of total body irradiation and hematopoietic stem cell transplant in children under 3 years of age. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 4, p. 700-4, Apr 2013. ISSN 1545-5017 (Electronic) 1545-5009 (Linking).
103. MURRY, D. J.; RIVA, L.; POPLACK, D. G. Impact of nutrition on pharmacokinetics of anti-neoplastic agents. **Int J Cancer Suppl**, v. 11, p. 48-51, 1998. ISSN 0898-6924 (Print) 0898-6924 (Linking).
104. NEIVA, C. M.; GUERINO, M. R.; MELLO, M. A. R. Análise dos efeitos da desnutrição Proteico-calórica sobre as respostas ao Exercício agudo (single section) Parâmetros metabólicos. **Motriz**, v. 1, n. 1, p. 32-43, 1999.

105. NEUMANN, D. A. **Cinesiologia de Aparelho Musculoesquelético: Fundamentos para Reabilitação Física**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 593. p 85-277-1121-4.

106. NORDBY, D. J.; FIELD, R. A.; RILEY, M. L.; KERCHER, C. J. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on growth, muscle cellularity, fiber type and carcass composition in lambs. **J Anim Sci**, v. 64, n. 5, p. 1419-27, May 1987. ISSN 0021-8812 (Print) 0021-8812 (Linking).

107. NWOKOCHA, C.; NWOKOCHA, M. I.; MOUNMBEGNA, P. P.; OWU, D. U.; ONYEZULIGBO, O.; OLU-OSIFO, E. H.; OKOJIE, E.; ASUQUO, E.; THAXTER, K.; OGUNSALU, C. Serum lipids, proteins and electrolyte profiles in rats following total body irradiation. **West Indian Med J**, v. 61, n. 2, p. 117-121, Mar 2012a. ISSN 0043-3144 (Print) 0043-3144 (Linking).

108. NWOKOCHA, C.; NWOKOCHA, M.; MOUNMBEGNA, P.; ORHUE, J.; ONYEZULIGBO, O.; OLU-OSIFO, E. H.; OKOJIE, E.; ASUQUO, E.; EJIMOFOR, T.; IKENNA, N.; JUDITH, M. Proteins and liver function changes in rats following cumulative total body irradiations. **West Indian Med J**, v. 61, n. 8, p. 773-777, Nov 2012b. ISSN 0043-3144 (Print) 0043-3144 (Linking).

109. OGATA, TAKURO A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibers. **Acta Medica Okayama**, v. 12, n. 1, p. 233-40, 1958.

110. OLIVÉ, M.; BLANCO, R.; RIVERA, R.; CINOS, C.; FERRER, I. Cell death induced by gamma irradiation of developing skeletal muscle. **J Anat**, v. 187 n. 1, p. 127-132, Aug 1995. ISSN 0021-8782

111. ONAL, C.; SONMEZ, A.; ARSLAN, G.; SONMEZ, S.; EFE, E.; OYMAK, E. Evaluation of field-in-field technique for total body irradiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 83, n. 5, p. 1641-1648, Aug 2012. ISSN 1879-355X (Electronic) 0360-3016 (Linking).

112. ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G. **Avaliação do padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofias musculares progressivas**. 2009. 71. p (Dissertação de mestrado). Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo.

113. OUMI, M.; MIYOSHI, M.; YAMAMOTO, T. Ultrastructural changes and glutathione depletion in the skeletal muscle induced by protein malnutrition. **Ultrastruct Pathol**, v. 25, n. 6, p. 431-6, Nov-Dec 2001. ISSN 0191-3123

114. 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, n. 5, p. 451-7, 2000. ISSN 0914-9465

115. PAIVA, MD; SOUZA, T. O.; CANON, F.; PEROT, C.; XAVIER, L. C.; FERRAZ, K. M.; OSORIO, M. M.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; LAMBERTZ, D. Stunting delays

maturation of triceps surae mechanical properties and motor performance in prepubertal children. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 12, p. 4053-61, Dec 2012. ISSN 1439-6327 (Electronic) 1439-6319 (Linking).

116. PARK, KYONG SOO; KIM, SUK KYEONG; KIM, MIN SEON; CHO, EUN YOUNG; LEE, JONG HO; LEE, KI-UP; PAK, YOUNGMI KIM; LEE, HONG KYU Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3085-3090, 2003. ISSN 0022-3166.

117. PERRIN, B. J.; ERVASTI, J. M. The actin gene family: function follows isoform. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 67, n. 10, p. 630-4, Oct 2010. ISSN 1949-3592 (Electronic) 1949-3592 (Linking).

118. PETTE, D.; STARON, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 116, p. 1-76, 1990. ISSN 0303-4240 (Print) 0303-4240 (Linking).

119. PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**, v. 50, n. 6, p. 500-9, Sep 15 2000. ISSN 1059-910X (Print) 1059-910X (Linking).

120. PETTE, DIRK; STARON, ROBERT S Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. **International review of cytology**, v. 170, p. 143-223, 1997. ISSN 0074-7696.

121. PHELAN, J. N.; GONYEA, W. J. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. **Anat Rec**, v. 247, n. 2, p. 179-188, Feb 1997. ISSN 0003-276X (Print) 0003-276X (Linking).

122. PIOVESAN, ROBERTO FARINA; MARTINS, MANOELA DOMINGUES; FERNANDES, KPS; BUSSADORI, SANDRA KALIL; SELISTRE-DE-ARAÚJO, HELOÍSA SOBREIRO; MESQUITA-FERRARI, RAQUEL AGNELLI Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioter Mov**, v. 22, n. 2, p. 211-20, 2009.

123. POPOVA, M. F.; BULIAKOVA, N. V.; AZAROVA, V. S. [Tissue interactions of regenerating muscle tissue with skeletal muscle under the effect of ionizing radiation]. **Arkh Anat Gistol Embriol**, v. 95, n. 12, p. 35-40, Dec 1988. ISSN 0004-1947

124. POPOVA, M. F.; IL'IASOVA SH, G. [Effect of helium-neon laser rays on the process of regeneration of irradiated transplanted skeletal muscle]. **Biull Eksp Biol Med**, v. 86, n. 7, p. 64-67, 1978. ISSN 0365-9615.

125. PRAKASH, YS; FOURNIER, M; SIECK, GARY C Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 3, p. 1044-1052, 1993. ISSN 8750-7587.

126. QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-777, Jun 2005. ISSN 0899-9007.
127. RANVIER, L Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. **CR Acad Sci Paris**, v. 77, p. 1030-1034, 1873.
128. REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166
129. REIS FILHO, A. No pain, no gain? Será? In: REIS & SANTINI ASSESSORIA E CONSULTORIA. Mato Grosso, 2014. Disponível em < http://reis-santini.blogspot.com.br/2014_07_01_archive.html >. Acesso em: 20 maio 2014
130. ROSENBLATT, J. D.; PARRY, D. J. Adaptation of rat extensor digitorum longus muscle to gamma irradiation and overload. **Pflugers Arch**, v. 423, n. 3-4, p. 255-264, May 1993. ISSN 0031-6768 (Print) 0031-6768 (Linking).
131. ROSS, J. J.; DUXSON, M. J.; HARRIS, A. J. Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles. **Development**, v. 100, n. 3, p. 395-409, Jul 1987. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking).
132. RUSSELL, J. A.; CONNOR, N. P. Effects of age and radiation treatment on function of extrinsic tongue muscles. **Radiat Oncol**, v. 9, n. 1, p. 254, Dec 4 2014. ISSN 1748-717X (Electronic) 1748-717X (Linking).
133. RYAN, J. L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 985-93, Mar 2012. ISSN 1523-1747 (Electronic) 0022-202X (Linking).
134. SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 339-349, 2004. ISSN 1415-5273.
135. SCHIAFFINO, STEFANO; REGGIANI, CARLO Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, 2011. ISSN 0031-9333.
136. SCHWENEN, M.; ALTMAN, K. I.; SCHRODER, W. Radiation-induced increase in the release of amino acids by isolated, perfused skeletal muscle. **Int J Radiat Biol**, v. 55, n. 2, p. 257-269, Feb 1989. ISSN 0955-3002
137. SEGRETO, R. A.; SEGRETO, H. R. C. Radiação ionizante e resposta celular - atualidades. **Radiol Bras**, v. 30, p. 301-307, 1997.
138. SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 6, p. 624-30, Jun 2013. ISSN 2008-7802 (Print) 2008-7802 (Linking).

139. SHETERLINE, P.; SPARROW, J. C. Actin. **Protein Profile**, v. 1, n. 1, p. 1-121, 1994. ISSN 1070-3667 (Print) 1070-3667 (Linking).
140. SHTIFMAN, A.; PEZONE, M. J.; SASI, S. P.; AGARWAL, A.; GEE, H.; SONG, J.; PEREPLETCHIKOV, A.; YAN, X.; KISHORE, R.; GOUKASSIAN, D. A. Divergent modification of low-dose ^{56}Fe -particle and proton radiation on skeletal muscle. **Radiat Res**, v. 180, n. 5, p. 455-464, Nov 2013. ISSN 1938-5404 (Electronic) 0033-7587 (Linking).
141. SILVA, MAELI DAL PAI; CARVALHO, ROBSON FRANCISCO Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 21-31, 2007. ISSN 1516-3598.
142. SKIPPER, A. Agreement on defining malnutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 36, n. 3, p. 261-2, May 2012. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071 (Linking).
143. STARON, R. S.; KRAEMER, W. J.; HIKIDA, R. S.; FRY, A. C.; MURRAY, J. D.; CAMPOS, G. E. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 117-23, Feb 1999. ISSN 0948-6143 (Print) 0948-6143 (Linking).
144. STARON, ROBERT S Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 22, n. 4, p. 307-327, 1997. ISSN 1066-7814.
145. SYRJALA, K. L.; LANGER, S. L.; ABRAMS, J. R.; STORER, B. E.; MARTIN, P. J. Late effects of hematopoietic cell transplantation among 10-year adult survivors compared with case-matched controls. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 27, p. 6596-606, Sep 20 2005. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking).
146. TAUHATA, LUIZ; SALATI, IVAN; DI PRINZIO, RENATO; DI PRINZIO, ANTONIETA R Radioproteção e dosimetria. **CEP**, v. 22783, p. 127, 2003.
147. TAVANO, O; DEZOTTI, SMG; IWAKI, LCV Comparação entre a densidade óptica obtida pelo método convencional e densidade radiográfica obtida pelo programa Adobe photoshop 5.0 em filmes radiográficos Kodak TMS-1. **Rev ABRO**, v. 2, n. 1, p. 7-14, 2000.
148. TERMIN, A; STARON, RS; PETTE, D Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. **Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 453-457, 1989. ISSN 0301-5564.
149. THOMAS, O.; MAHE, M.; CAMPION, L.; BOURDIN, S.; MILPIED, N.; BRUNET, G.; LISBONA, A.; LE MEVEL, A.; MOREAU, P.; HAROUSSEAU, J.; CUILIERE, J. Long-term complications of total body irradiation in adults. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 49, n. 1, p. 125-31, Jan 1 2001. ISSN 0360-3016 (Print) 0360-3016 (Linking).

150. TOSCANO, A. E.; CASTRO, R. M.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270-8, Mar 2008. ISSN 0899-9007
151. TOSCANO, A. E.; FERRAZ, K. M.; CASTRO, R. M.; CANON, F. Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. **Clinics (São Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1363-9, 2010. ISSN 1980-5322 (Electronic) 1807-5932 (Linking).
152. TOSCANO, A.E. ; BARROS, K. M.; GOUBEL, F. ; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Mechanical properties in young and adult rat muscles submitted to neonatal undernutrition. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. Suppl. 1, p. S490, 2006.
153. UNSAL, D.; MENTES, B.; AKMANSU, M.; UNER, A.; OGUZ, M.; PAK, Y. Evaluation of nutritional status in cancer patients receiving radiotherapy: a prospective study. **Am J Clin Oncol**, v. 29, n. 2, p. 183-8, Apr 2006. ISSN 1537-453X (Electronic) 0277-3732 (Linking).
154. ICRP 2000, Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures. ICRP Publications 85 Ann ICRP 30(2):7-67.,2000
155. VAN LEEUWEN-SEGARCEANU, E. M.; DORRESTEIJN, L. D.; PILLEN, S.; BIESMA, D. H.; VOGELS, O. J.; VAN ALFEN, N. Progressive muscle atrophy and weakness after treatment by mantle field radiotherapy in Hodgkin lymphoma survivors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 82, n. 2, p. 612-618, Feb 1 2012. ISSN 1879-355X (Electronic) 0360-3016 (Linking).
156. VASILE, M.; TEREN, O.; CIUPINA, V.; TURCU, G. Changes of electrophoretical fractions in simultaneous exposure to gamma radiation and hyper-barism. **Romanian Rep Phys**, v. 61, p. 121-8, 2009.
157. VEGINE, PATRÍCIA MARÇAL; FERNANDES, ANA CAROLINA PACKNESS; TORRES, MÁRCIA REGINA SIMAS GONÇALVES; SILVA, MARIA INÊS BARRETO; AVESANI, CARLA MARIA Avaliação de métodos para identificar desnutrição energético-proteica de pacientes em hemodiálise. **J. bras. nefrol**, v. 33, n. 1, p. 55-61, 2011. ISSN 0101-2800.
158. VIANA, W. C. M.; LAMBERTZ, D.; BORGES, E. S.; NETO, A. M. O.; T LAMBERTZ, K. M. F.; AMARAL, A. Serum Protein Concentration In Low-Dose Total Body Irradiation Of Normal And Malnourished Rats. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 118, set 2016. ISSN 0969-8043.
159. VIANA, W.; LAMBERTZ, D.; BORGES, E.; MELO, J. A.; LAMBERTZ, K.; AMARAL, A. Late Effects of Radiation on Skeletal Muscle: An Open Field of Research. **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 8, n. 8, p. 555-570, Ago 2015.
160. VOITSITSKII, V. M.; FEDOROV, A. N.; LUGOVSKII, E. B.; DERZSKAIA, S. G.; KHIZHNIK, S. V.; KURSKII, M. D.; KUCHERENKO, N. E. [The effect of ionizing

radiation on the structure of the hydrophobic fragment of Ca-ATPase in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum]. **Radiobiologia**, v. 30, n. 1, p. 16-9, Jan-Feb 1990. ISSN 0033-8192

161. VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Desnutrição: metabolismo protéico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício. **Motriz**, v. 14, n. 1, p. 74-84, jan./mar 2008.

162. WANG, Z.; YANG, W. L.; JACOB, A.; AZIZ, M.; WANG, P. Human ghrelin mitigates intestinal injury and mortality after whole body irradiation in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0118213, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

163. WAREHAM, A. C.; MAHON, M.; BEDI, K. S.; SMART, J. L. Early life undernutrition in rats. 2. Some contractile properties of skeletal muscles from adult animals. **Br J Nutr**, v. 47, n. 3, p. 433-7, May 1982. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145 (Linking).

164. WATTERSON, C.; FRASER, A.; BANKS, M.; ISENRING, E.; MILLER, M.; SILVESTER, C.; HOEVENAARS, R.; BAUER, J.; VIVANTI, A.; FERGUSON, M. Evidence based practice guidelines for the nutritional management of malnutrition in patients across the continuum of care. **Nutrition & Dietetics**, v. 66, p. S1-S34., 2009.

165. WERNIG, A.; ZWEYER, M.; IRINTCHEV, A. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. **J Physiol**, v. 522 Pt 2, p. 333-345, Jan 15 2000. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking).

166. WHICHER, J.; SPENCE, C. When is serum albumin worth measuring? **Ann Clin Biochem**, v. 24 (Pt 6), p. 572-80, Nov 1987. ISSN 0004-5632 (Print) 0004-5632 (Linking).

167. WHITE, P; CATTANEO, D; DAUNCEY, MJ Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 02, p. 185-194, 2000. ISSN 1475-2662.

168. WILLIAMS, JPG; TANNER, JM; HUGHES, PCR Catch-up growth in male rats after growth retardation during the suckling period. **Pediatric research**, v. 8, n. 3, p. 149-156, 1974. ISSN 0031-3998.

169. WILLS, C. ; CHERIAN, S.; YOUSEF, J.; WANG, K. ; MACKLEY, HB. Total body irradiation: A practical review. **Appl Rad Oncol**, v. 5, n. 5, p. 11-17, 2016.

170. WILSON, SJ; ROSS, JJ; HARRIS, AJ A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development**, v. 102, n. 4, p. 815-821, 1988. ISSN 0950-1991.

171. YATES, L. D.; GREASER, M. L. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. **J Mol Biol**, v. 168, n. 1, p. 123-41, Jul 25 1983. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).

172. ZAIA, DIMAS AM; ZAIA, CTBV; LICHTIG, JAIM Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

173. ZAIA, DIMAS AUGUSTO MOROZIN; MARQUES, FÁBIO RANGEL; ZAIA, CÁSSIA THAÏS BUSSAMRA VIEIRA Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: a comparative study among dye-binding methods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 385-388, 2005. ISSN 1516-8913.

174. ZHU, M. J.; FORD, S. P.; MEANS, W. J.; HESS, B. W.; NATHANIELSZ, P. W.; DU, M. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J Physiol**, v. 575, n. Pt 1, p. 241-50, Aug 15 2006. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking).

175. ZHU, M. J.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W.; DU, M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. **Biol Reprod**, v. 71, n. 6, p. 1968-73, Dec 2004. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking).

Anexo I

Parecer do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 18 de outubro de 2013.

Ofício nº 636/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz**
Departamento de Fisioterapia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.021454/2013-69

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Radiação Ionizante: efeito sobre os componentes contráteis e elásticos da musculatura esquelética em ratos submetidos ou não à desnutrição precoce.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério, Fazenda, aviário, etc. do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 90 dias; Peso: 300g; sexo: machos ; Nº total de animais: 40.

Atenciosamente


 Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo II

Produção Científica

1. VIANA, W.; LAMBERTZ, D.; BORGES, E.; MELO, J. A.; LAMBERTZ, K.; AMARAL, A. Late Effects of Radiation on Skeletal Muscle: An Open Field of Research. J. Biomedical Science and Engineering, v. 8, n. 8, p. 555-570, Ago 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2015.88052>.
2. VIANA, W. C. M.; LAMBERTZ, D.; BORGES, E. S.; NETO, A. M. O.; T LAMBERTZ, K. M. F.; AMARAL, A. Serum Protein Concentration In Low-Dose Total Body Irradiation Of Normal And Malnourished Rats. Applied Radiation and Isotopes, v. 118, set 2016. ISSN 0969-8043. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2016.09.015>