

ANÁLISE DO FENÓTIPO MUSCULAR DE CAMUNDONGOS COM DUPLA CARGA DE MÁ NUTRIÇÃO

Palavras-Chave: Fenótipo Muscular; Má Nutrição; Desnutrição; Obesidade.

Cristian Vitor Almeida dos Santos – FEF/UNICAMP

Leticia Barssotti – IB/UNICAMP

Israelle Netto Freitas – IB/UNICAMP

Ana Paula Couto Davel – IB/UNICAMP

Lígia M Antunes-Correa (Orientadora) – FEF/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A má nutrição se refere ao desequilíbrio, deficiência ou excesso na ingestão e utilização de nutrientes, contribuindo tanto para subnutrição quanto para excesso de peso e obesidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2020, no mundo todo, entre crianças menores de 5 anos, aproximadamente 149 milhões apresentavam baixa estatura para a idade, 45 milhões baixo peso para a estatura e 38,9 milhões sobrepeso ou obesidade. Além disso, dados epidemiológicos mostram que cerca de 45% das mortes dessas crianças estão relacionadas à má nutrição⁽¹⁾. Embora normalmente associada a condições socioeconômicas, a subnutrição também pode estar associada a outras doenças. Dados da literatura mostram que entre 2,5% e 51% dos pacientes pediátricos hospitalizados ou precisando de assistência médica apresentam subnutrição, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento⁽²⁾. Por outro lado, nos últimos anos a prevalência de obesidade tem aumentado significativamente, especialmente em adultos e em países de baixa renda⁽³⁾.

Já é bem conhecido que quadros de subnutrição estão associados com alterações na estrutura e função muscular^(4, 5). A subnutrição contribui para o aparecimento da sarcopenia, que é definida como a redução da quantidade e qualidade muscular, bem como redução da força e função muscular⁽⁶⁾. A sarcopenia está associada ao envelhecimento e/ou patologias, como doenças cardiovasculares e o câncer, e contribui para redução da capacidade funcional e qualidade de vida^(7, 8). Apesar do aumento da massa corporal, alguns pacientes obesos também apresentam alterações no fenótipo muscular, com redução na quantidade e função muscular. Esse quadro tem sido denominado obesidade sarcopênica⁽⁹⁾. Os mecanismos associados a essas alterações têm sido amplamente estudados. No entanto, o papel da dupla carga de má nutrição no fenótipo do músculo esquelético não está elucidada até o momento. Nosso grupo hipotetizou que animais subnutridos nas fases iniciais da vida, seguida de dieta hipercalórica na fase adulta apresentam redução da massa muscular. Dessa forma, nosso objetivo primário foi analisar a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo de camundongos com dupla carga de má nutrição.

METODOLOGIA:

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (CEUA: 6055-1/2022). Foram utilizados 20 camundongos C57Bl/6 provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biologia/UNICAMP, em gaiolas coletivas sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o desmame (28 dias de vida), os camundongos foram aleatoriamente divididos nos grupos: 1) controle (CC): alimentado com ração normoproteica (14% proteínas) por 16 semanas; 2) restrição proteica + controle (RC): alimentados com ração hipoproteica (6% proteínas) por 6 semanas, seguida de dieta normoproteica por 10 semanas; 3) controle + dieta hiperlipídica (CH): alimentados com ração normoproteica por 6 semanas, seguida de ração hiperlipídica (45% gordura) por 10 semanas; e 4) restrição proteica + dieta hiperlipídica (RH): alimentados com ração hipoproteica por 6 semanas, seguida de dieta hiperlipídica por 10 semanas.

A massa corporal (g) e o comprimento crânio-caudal (cm) foram medidos antes da eutanásia. Após a realização da eutanásia, sob anestesia, ocorreu a extração do músculo sóleo em ambas as patas. O músculo sóleo da pata esquerda foi fixado em formalina 10% e armazenado em temperatura ambiente. O músculo sóleo da pata direita foi congelado e imerso em Optimal Cutting Temperature (OCT), TissueTek® O.C.T compound 4583 e armazenado em biofreezer a -80°C . Adicionalmente, foi realizada a medida do comprimento da tíbia de ambas as patas (cm).

Para o processamento histológico, as amostras do músculo sóleo armazenadas em formalina foram imersas em soluções de gradação alcoólica crescente, clarificadas em xilol e emblocados em parafina aquecida. Após serem emblocados, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo na espessura de $5\mu\text{m}$. As secções musculares colocadas em lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Easypath) e fixadas com entellan (Merck)⁽¹⁰⁾. A captura das imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus 29 Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA) acoplado à câmera digital com objetiva de 20X (Olympus DP71, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA) e a imagem processada em computador. A área da secção transversa das fibras do músculo sóleo (μm^2) de todas as imagens/campos capturados foram analisadas pelo programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD). Foram avaliadas, em média, 800 fibras musculares por grupo. Os músculos armazenados em OCT serão utilizados na próxima fase deste estudo para analisar o infiltrado de gordura muscular.

Os resultados estão expressos em média e desvio padrão de média. As possíveis diferenças entre os grupos foram avaliadas pela ANOVA 1-FATOR. Em caso de significância foi aplicado o *post hoc de Tukey*. Em todas as análises, a significância estatística foi considerada para $p\leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O peso e comprimento naso-caudal estão representados na Tabela 1. Em relação ao peso, observamos que antes da eutanásia os animais do grupo RH, alimentado com restrição proteica na

infância e dieta hiperlipídica na fase adulta, apresentaram maior massa corporal em comparação com o grupo CC, alimentado com dieta normoproteica durante toda a vida e o grupo RC, alimentado com restrição proteica na infância e dieta normoproteica na fase adulta. Da mesma forma, o grupo CH, alimentado com dieta normoproteica na infância e dieta hiperlipídica na idade adulta, apresentou maior massa corporal em comparação com o grupo RC. Não observamos diferenças significativas entre os grupos CH e RH. Esses resultados sugerem que a dieta hiperlipídica na fase adulta aumenta a massa corporal dos animais em excesso, independentemente da alimentação na infância. Em relação ao comprimento naso-caudal observamos que os animais do grupo RH apresentaram maior comprimento quando comparados com os grupos CC e RC. No entanto, não encontramos diferenças significativas entre os grupos no comprimento da tíbia.

Tabela 1. Características físicas dos animais

	CC (n=5)	CH (n=5)	RC (n=5)	RH (n=5)
Massa Corporal(g)	33,98 ± 1,45	40,76 ± 6,04	31,78 ± 1,80 [#]	42,60 ± 1,83 ^{*†}
Comp. Naso-caudal (cm)	8,82 ± 0,25	9,14 ± 0,41	8,82 ± 0,19	9,40 ± 0,23 ^{*†}
Comp. Tíbia Esquerda (cm)	1,75 ± 0,05	1,74 ± 0,08	1,76 ± 0,03	1,74 ± 0,05

CC: dieta controle; CH: dieta controle + dieta hiperlipídica; RC: restrição proteica + dieta controle; RH: restrição proteica + dieta hiperlipídica. *vs. CC; [#]vs. CH; [†]vs. RC. *P* < 0,05.

Ao analisar o músculo sóleo de animais, observamos que os grupos RH e CH, ambos alimentados com dieta hiperlipídica na fase adulta, apresentaram redução da área de secção transversa das fibras musculares em comparação com o grupo CC, alimentado com dieta normoproteica controle durante toda a vida (Figura 1).

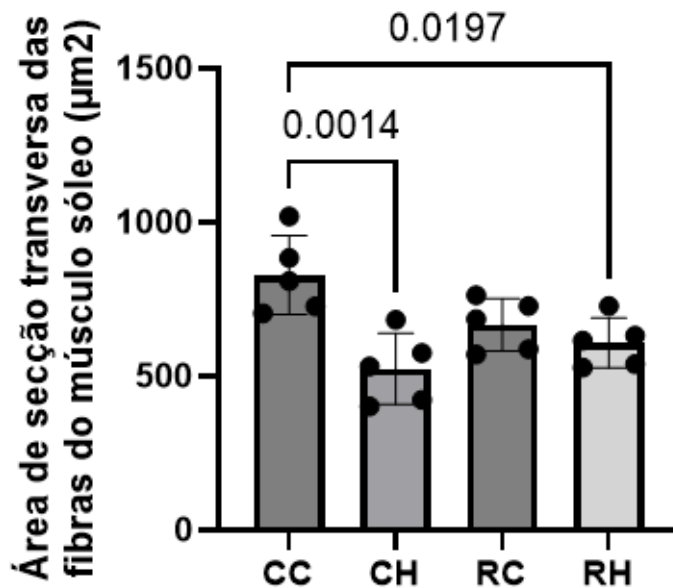


Figura 1. Área de secção transversa das fibras do músculo sóleo. CC: dieta controle; CH: dieta controle + dieta hiperlipídica; RC: restrição proteica + dieta controle. $P < 0,05$.

Em conjunto, nossos resultados mostram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica na fase adulta, apesar de apresentarem aumento da massa corporal, apresentaram redução da área de secção transversa das fibras do músculo sóleo. A redução da massa muscular em animais e indivíduos obesos tem sido estudada nos últimos anos e denominada obesidade sarcopênica. A obesidade sarcopênica é uma condição que altera a função muscular, prejudicando a capacidade funcional e a qualidade de vida⁽¹⁴⁾. Adicionalmente, é possível que ocorra aumento do depósito ectópico de gordura intramuscular, bem como aumento de tecido fibroso. Cabe ressaltar que a alteração da qualidade do tecido muscular tem sido apontada como fator fundamental para a manutenção da função muscular. Nesse sentido, o aumento de infiltrado de gordura e tecido fibroso podem comprometer a função muscular de animais e indivíduos obesos. Além disso, o aumento de deposição de gordura intramuscular pode levar à disfunção metabólica, favorecendo o envelhecimento do tecido muscular, o que também contribui para o desenvolvimento da obesidade sarcopênica^(14, 15, 16). Por fim, a obesidade sarcopênica tem sido associada a outras condições clínicas como a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica, apneia obstrutiva do sono e complicações na esfera psicossocial⁽¹⁴⁾.

CONCLUSÃO:

Animais alimentados com dieta hiperlipídica na fase adulta apresentam aumento da massa corporal e redução da área de secção transversa das fibras do músculo sóleo. Em conjunto, esses

resultados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica na fase adulta contribui para o desenvolvimento da obesidade sarcopênica.

REFERÊNCIAS:

1. Fact sheets. Malnutrition. World Health Organization. Available: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/malnutrition>
2. McCarthy A, Delvin E, Marcil V, Belanger V, Marchand V, Boctor D, et al. Prevalence of Malnutrition in Pediatric Hospitals in Developed and In-Transition Countries: The Impact of Hospital Practices. *Nutrients*. 2019;11: 236. doi:10.3390/nu11020236.
3. Prentice AM. The Double Burden of Malnutrition in Countries Passing through the Economic Transition. *Ann Nutr Metab*. 2018;72: 47–54. doi:10.1159/000487383.
4. Arends J, Baracos V, H. Bertz, Bozzetti F, Calder PC, Deutz NEP, Erickson N, Laviano A, Lisanti MP, Lobo DN, McMillan DC, Muscaritoli M, Ockenga J, Pirlich M, Strasser F, de van der Schueren M, Van Gossum A, Vaupel P, Weimann A. ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. *Clinical Nutrition*, 2017; 36;5: 1187-1196. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.017>.
5. Arends J, Bachmann P, Baracos V, Barthelemy N, Bertz H, Bozzetti F, Fearon K, Hütterer E, Isenring E, Kaasa S, Krznaric Z, Laird B, Larsson M, Laviano A, Mühlebach S, Muscaritoli M, Oldervoll L, Ravasco P, Solheim T, Strasser F, de van der Schueren M, Preiser JC. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical Nutrition*, 2017; 36;1: 11-48. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.07.015>.
6. Lortie J, Rush B, Osterbauer K, Colgan TJ, Tamada D, Garlapati S, Campbell TC, Traynor A, Leal T, Patel V, Helgager JJ, Lee K, Reeder SB, Kuchnia AJ. Myosteosis as a Shared Biomarker for Sarcopenia and Cachexia Using MRI and Ultrasound. *Front Rehabil Sci*. 2022; 30;3: 896114.
7. Gontarev S, Jakimovski M, Georgiev G. Using relative handgrip strength to identify children at risk of sarcopenic obesity. *Nutr. Hosp*. 2020; 37(3): 490-496.
8. Steffl M, Chrudimsky J, Tufano JJ. Using relative handgrip strength to identify children at risk of sarcopenic obesity. *PLoS One*. 2017; 23;12(5):e0177006.
9. Axelrod CL, Dantas WS, Kirwan JP. Sarcopenic obesity: emerging mechanisms and therapeutic potential. *Metabolism*. 2023 Sep;146:155639. doi: 10.1016/j.metabol.2023.155639. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37380015.
10. Dong J, Yu J, Li Z, Gao S, Wang H, Yang S, Wu L, Lan C, Zhao T, Gao C, Liu Z, Wang X, Hao J. Serum insulin-like growth factor binding protein 2 levels as biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma-associated malnutrition and muscle wasting. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2021; 12: 704–716.
11. Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol*. 2001; 116;63–68.
12. Jung TW, Park HS, Choi GH, Kim D, Lee T. β -aminoisobutyric acid attenuates LPS-induced inflammation and insulin resistance in adipocytes through AMPK-mediated pathway. *J Biomed Sci*. 2018; 25-27.
13. Miljkovic I, Vella CA, Allison M. Computed Tomography-Derived Myosteosis and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab Journal*. 2021; 45(4):482-491.
14. Zembura M, Matusik P. Sarcopenic Obesity in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 1;13:914740. doi: 10.3389/fendo.2022.914740.
15. Sack C, Ferrari N, Friesen D, Haas F, Klaudius M, Schmidt L, Torbahn G, Wulff H, Joisten C. Health Risks of Sarcopenic Obesity in Overweight Children and Adolescents: Data from the CHILT III Programme (Cologne). *J Clin Med*. 2022 Jan 5;11(1):277. doi: 10.3390/jcm11010277.
16. Wannamethee SG, Atkins JL. Perda muscular e obesidade: as implicações para a saúde da sarcopenia e da obesidade sarcopênica. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;74(4):405-412. doi:10.1017/S002966511500169X.