PHABLO SÁVIO ABREU TEIXEIRA

Efeito dos ácidos linoleico e oleico na regeneração do músculo
gastrocnêmio de ratos após laceração

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

PHABLO SÁVIO ABREU TEIXEIRA

Efeito dos ácidos linoleico e oleico na regeneração do
músculo gastrocnêmio de ratos após laceração

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Teixeira, Phablo Sávio Abreu.

Efeito dos ácidos linoleico e oleico na regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos após laceração / Phablo Sávio Abreu Teixeira. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo e função celular.

Versão do título para o inglês: Effect of linoleic and oleic acids on regeneration of gastrocnemius muscle after laceration in rats.

1. Laceração muscular 2. Músculo esquelético 3. Ácidos graxos 4. Função contrátil 5. Mioblastos e miotubos 6. Fibroblastos I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0176/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Phablo Sávio Abreu Teixeira.

Título da Tese: Efeito dos ácidos linoleico e oleico na regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos após laceração.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 058.14

São Paulo, 31 de julho de 2014.

REF.: Protocolo nº 078/11.

"Miogênese e regeneração do músculo esquelético: Possível modulação pelo ácido linoléico"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 19.07.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA,
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.
Prof. Dr. Rui Curi
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho ao meu orientador Prof. Dr. Rui Curi, que exerceu papel de um pai; a minha melhor amiga, minha mãe; ao meu incentivador, meu pai; a minhas queridas irmãs e sobrinha; ao meu melhor amigo, Ariel; e a minha melhor companhia, Gislaine.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, tudo.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, minha maior admiração.

Ao Prof. Dr. Sandro Hirabara, meu maior apreço.

Aos amigos do laboratório, Carlos Hermano, Kaio Vitzel, Diogo Vasconcelos, Marco Fortes, Gabriel Nassr, Fábio Takeo, Renato Nachbar, minha gratidão.

Aos colegas do laboratório Alcione Lescano, Luis Gustavo, Laureane, Amanda Crisma, Mariana Davanzo, Maysa Cruz, Roberta Cunha, Thiago Belchior, Amanda Roque, Cátia Lira, Carlos Flores, Marco Vinolo, Vitor, Hosana, Mit, meu respeito.

Aos funcionários Tatiana Alba-Loureiro, Roberto Mendonça (Bob), Gilson Murata, Paloma e José Maria, meu reconhecimento.

A todos os membros do laboratório, biblioteca, segurança, limpeza, minha saudável lembrança.

Aos professores, Toninho, Carla, Zequinha, Maria Tereza, Silvana, Léo, minha reverência.

Aos animais de laboratório, que se comprometeram mais do que eu com a tese, minha responsabilidade.

Aos meus amigos atletas, Raphael Matos, Ale Borges, Bruno Ciaco, Felipe Boselli, Sensei Sérgio Longo, minhas risadas.

Ao Ariel, meu melhor amigo.

Á Gislaine, meu melhor presente. Á sua família, minha família.

Ao meu lar, Ludimila, Thalyta e Melissa, minha incondicionalidade.

Ao meu Pai, Sávio, o distinto incentivo.

Á minha Mãe, Gerli, minha melhor amizade.

Á FAPESP, CAPES e CNPq, minha manutenção e suporte financeiro.

Á todos, muito obrigado pela compreensão e apoio.

Neste instante, estou voando...

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, cada um pode
começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

RESUMO

ABREU, P. S. T. **Efeito dos ácidos linoleico e oleico na regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos após laceração**. 2014. 156 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Avaliou-se o efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (0,44g por Kg de peso corpóreo) por quatro semanas sobre a regeneração do músculo gastrocnêmio lacerado em ratos. Os efeitos dos ácidos graxos (100 μ M) foram também avaliados em mioblastos, miotubos e fibroblastos em cultura para se determinar o mecanismo envolvido. A laceração provocou aumento da razão oleico/esteárico e palmitoleico/palmitico indicadores da atividade de dessaturase. Promoveu diminuição das forças isotônica específica e tetânicas absoluta e específica. Ocorreu queda da resistência à fadiga e aumento da área de tecido fibroso. Esses achados indicam regeneração incompleta e recuperação parcial da função contrátil do músculo lesionado. A suplementação com o ácido linoleico diminuiu a massa, a força isotônica específica, a resistência à fadiga e a área de secção transversa das fibras dos músculos gastrocnêmios contralateral e lesionado, reduziu a força tetânica específica e elevou o conteúdo de *p-S6* e *Pax7* no músculo contralateral; aumentou a área de tecido fibroso e reduziu o conteúdo de *alfa actina* no músculo lesionado. O tratamento de fibroblastos com ácido linoleico diminuiu a expressão de mRNA de *PCNA*, colágeno e fibronectina. Por sua vez, a suplementação com o ácido oleico não modificou a massa e a área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio; aboliu a diminuição da força isotônica específica e o aumento da área de tecido fibroso induzidos pela lesão; preveniu a queda das forças tetânica, absoluta e específica, e aumentou a resistência à fadiga e o conteúdo de vimentina nos músculos gastrocnêmios contralateral e lesionado. O tratamento com ácido oleico *in vitro* aumentou o conteúdo de mRNA de *MyoD* em mioblastos, de desmina em miotubos já diferenciados e inibiu a expressão de mRNA de *PCNA*, colágeno e fibronectina em fibroblastos. Concluímos que a suplementação com o ácido linoleico comprometeu a regeneração do músculo esquelético lesionado, causando redução da massa muscular e elevação de tecido fibroso, comprometendo a função contrátil. O ácido oleico, por sua vez, atenuou o quadro de reparo incompleto, otimizando a capacidade regenerativa e a função contrátil do músculo lesionado.

Palavras-chave: Laceração muscular. Músculo esquelético. Ácidos graxos. Função contrátil. Mioblastos. Miotubos e Fibroblastos.

ABSTRACT

ABREU, P. S. T. **Effect of linoleic and oleic acids on regeneration of gastrocnemius muscle after laceration in rats**. 2014. 156 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The effect of treatment with linoleic and oleic acids (0.44g per kg body weight) for four weeks on regeneration of lacerated gastrocnemius muscle in rats was evaluated. The effects of fatty acids (100 μ M) were also evaluated in cultured myoblasts, myotubes and fibroblasts to determine the mechanisms involved. The laceration itself raised the oleic/stearic acids and palmitoleic/palmitic acids ratios, suggesting increased activity of desaturase. Laceration promoted a reduction of specific twitch force and absolute and specific tetanic forces. Decreased resistance to muscle fatigue and increased area of fibrous tissue were also observed. These findings indicate incomplete regeneration and partial recovery of the contractile function of the injured muscle. The supplementation with linoleic acid reduced the mass, specific twitch force, the resistance to muscle fatigue and the cross-sectional area of fibers of the controlateral and injured gastrocnemius muscles, reduced the specific tetanic force and the contents of *p*-S6 and *Pax7* in controlateral gastrocnemius muscle; increased the area of fibrous tissue and reduced the content of alpha actin in injured muscle. The treatment in fibroblasts with linoleic acid reduced the expression (mRNA) of PCNA, collagen and fibronectin. In turn, the supplementation with oleic acid did not change the mass and cross-sectional area of the fibers of the gastrocnemius muscle; abolished the decrease of the specific twitch force and the increase of the fibrous tissue area in injured gastrocnemius muscle; prevented the fall of absolute and specific tetanic forces, and increased the resistance to muscle fatigue and the content of vimentin in controlateral and injured gastrocnemius muscles. The treatment with oleic acid increased the contents (mRNA) of *MyoD* in myoblasts, desmin in differentiated myotubes and inhibited the expression of *PCNA*, collagen and fibronectin in fibroblasts. We concluded that supplementation with linoleic acid impaired the regeneration of injured skeletal muscle, as indicated by reduced mass of the muscle and increase of fibrous tissue, leading to decreased contractile function. In turn, oleic acid attenuated the incomplete repair, optimizing the regenerative capacity and contractile function of the injured muscle.

Keywords: Muscle laceration. Skeletal muscle. Fatty acids. Contractile function. Myoblasts. Myotubes and Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Estrutura simplificada do músculo estriado esquelético</i>	25
Figura 2: <i>Esquema simplificado dos eventos que desencadeiam a contração do músculo esquelético</i>	27
Figura 3: <i>Estrutura simplificada dos componentes que formam a matriz extracelular do músculo esquelético</i>	29
Figura 4: <i>Hierarquia dos fatores regulatórios da progressão da diferenciação miogênica</i>	34
Figura 5: <i>Esquema simplificado das interações celulares que ocorrem durante a regeneração muscular</i>	36
Figura 6: <i>Esquema simplificado da fórmula molecular dos ácidos linoleico (A) e oleico (B) utilizados neste estudo</i>	38
Figura 7: <i>Protocolos experimentais utilizados no presente estudo</i>	57
Figura 8: <i>Indução da lesão no músculo gastrocnêmio</i>	59
Figura 9: <i>Força muscular (absoluta e específica), propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e resistência à fadiga <u>in situ</u> do músculo gastrocnêmio</i>	65
Figura 10: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a indução de lesão sobre a composição de ácidos graxos (% do total) no músculo gastrocnêmio (A)</i>	75
Figura 11: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a indução de lesão sobre a composição total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados n-3 e n-6 (A), razão entre ácidos graxos n-6/ n-3 (B) e razão oleico/ esteárico (C), no músculo gastrocnêmio</i>	78
Figura 12: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão sobre o peso úmido (g) dos músculos gastrocnêmio (A), sóleo (B) e EDL (C)</i>	79
Figura 13: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão sobre a massa de gordura retroperitoneal (A), subcutânea (B), epididimal (C) e mesentérica (D)</i>	80
Figura 14: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após lesão no músculo gastrocnêmio sobre as forças isotônica absoluta (1 Hz) (A) e isotônica específica (1Hz) (mN/ g) (B); e forças absoluta tetânica (100 Hz) (C) e tetânica específica (100 Hz) (mN/ g) (D)</i>	82
Figura 15: <i>Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão no músculo gastrocnêmio</i>	

sobre as propriedades contráteis, associadas ao tempo de contração TTP (ms) (A) e tempo de relaxamento HRT (ms) (B).....83

Figura 16: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre as curvas de resistência à fadiga (decaimento da força) (A), a resistência à fadiga na oitava, nona e décima contrações (B), 28 dias após a lesão no músculo gastrocnêmio).....85

Figura 17: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a média da área de secção transversa (A) e a dispersão dos dados individuais (B) do músculo gastrocnêmio analisadas por meio da coloração de HE 28 dias após lesão.....87

Figura 18: Imagens representativas do efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a morfologia do músculo gastrocnêmio analisada por meio da coloração de hematoxilina e eosina (HE) 28 dias após lesão. (Objetiva de 10X).....88

Figura 19: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a área de tecido fibroso do músculo gastrocnêmio analisadas por meio da coloração por Picro Sirius Red 28 dias após lesão (A).....90

Figura 20: Imagens representativas do efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a morfologia do músculo gastrocnêmio analisada por meio da coloração de Picro Sirius Red, 28 dias após lesão. (Objetiva de 10x).....91

Figura 21: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de desmina (B), vimentina (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão...92

Figura 22: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de p-NF-kappaB (B), NF-kappaB (C), e razão p-NF-kappaB/ NF-kappaB (D) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.....94

Figura 23: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de p-44-42 MAPK (B), 44-42 MAPK (C), e na razão p-44-42 MAPK/ 44-42 MAPK (D) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.....95

Figura 24: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de p-S6 (B), e S6 total (C), e na razão p-S6/ S6 no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.....97

Figura 25: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de MuRF1 (B), e Atrogina-1 (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão...98

Figura 26: Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de Pax7 (B), e Alfa actina (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão...99

Figura 27: <i>Efeito do tratamento <u>in vitro</u> de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 μM) durante a diferenciação por período de 24 horas para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD (A), Miogenina (B) e Myf6 (C).</i>	102
Figura 28: <i>Efeito do tratamento <u>in vitro</u> de miotubos (do quarto ao sétimo dia após indução de diferenciação) com os ácidos linoleico ou oleico (100 μM) pelo período de noventa e seis horas para análise dos conteúdos de mRNA de desmina (A), vimentina (B) e TRIM32 (C).</i>	104
Figura 29: <i>Efeito do tratamento <u>in vitro</u> de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μM) durante 72h para análise da expressão de mRNA de PCNA (A) e ciclina D1 (B).</i>	105
Figura 30: <i>Efeito do tratamento <u>in vitro</u> de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μM) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de colágeno (A), fibronectina (B) e pró-colágeno (C).</i>	106
Figura 31: <i>Representação esquemática dos resultados obtidos.</i>	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos de injúria por laceração.....	31
Tabela 2: Composição de ácidos graxos da dieta comercial utilizada no estudo.....	57
Tabela 3: Ingestão de ração (g/dia) dos animais suplementados com ácidos linoleico ou oleico (0,44 g/kg de peso corporal).....	58
Tabela 4. Sequência dos primers utilizados.....	71
Tabela 5: Dados referentes a Figura10A, apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	<i>Ácidos graxos livres</i>
ALT	<i>Alanina amino-transferase</i>
AST	<i>Aspartato amino-transferase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	<i>Trifosfato de adenosina</i>
CEUA	<i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>
COBEA	<i>Comissão Brasileiro de Experimentação Animal</i>
CG	<i>Cromatografia gasosa</i>
CO₂	<i>Dióxido de carbono</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DHA	<i>Ácido docosa-hexaenóico</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
EDL	<i>Extensor Digital Longo</i>
EPA	<i>Ácido eicosapentaenóico</i>
EPM	<i>Erro Padrão da Média</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FGF	<i>Fator de crescimento de fibroblastos</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase</i>
GLUT4	<i>Transportador de glicose 4</i>
HRT	<i>Half relaxation time</i>
ICB	<i>Instituto de Ciências Biomédicas</i>
IGF-1	<i>Fator de crescimento semelhante a insulina-1</i>
IL-1β	<i>Interleucina-1 beta</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
MRFs	<i>Fatores de regulação da miogênese</i> <i>Myogenic regulatory factors</i>
LDL	<i>Lipoproteínas de densidade baixa</i> <i>Low-density lipoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MuRF-1	<i>Muscle RING-finger protein 1</i>
Myf5	<i>Fator miogênico 5</i>

	<i>Myogenic factor 5</i>
<i>MyoD</i>	<i>Fator de diferenciação miogênica</i> <i>Myogenic differentiation factor</i>
<i>Myf6</i>	<i>Fator miogênico 6</i> <i>Myogenic factor 6</i>
<i>NF-kB</i>	<i>Fator nuclear – kappaB</i> <i>Nuclear factor – kappaB</i>
<i>Pax7</i>	<i>Paired box 7</i>
<i>PBS</i>	<i>Tampão fosfato</i>
<i>PCNA</i>	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular</i> <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
<i>PGC-1α</i>	<i>Co-ativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos – 1 alfa</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-ativator 1alpha</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fenilmetilsulfonilfluoreto</i>
<i>PPARα</i>	<i>Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
<i>PPARβ</i>	<i>Receptor beta ativado por proliferadores de peroxissomos</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor beta</i>
<i>PPARγ</i>	<i>Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos</i> <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reação em cadeia de polimerase quantitativa tempo real</i> <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
<i>S6K</i>	<i>S6 quinase</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio</i> <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>TG</i>	<i>Triacilgliceróis</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Fator transformador de crescimento-beta</i> <i>Transforming growth factor-beta</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Fator de necrose tumoral-alfa</i> <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
<i>TTP</i>	<i>Time to peak</i>

<i>USP</i>	<i>Universidade de São Paulo</i>
<i>VLDL</i>	<i>Lipoproteína de densidade muito baixa</i> <i>Very low-desity lipoprotein</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>Tyrosine 3-monooxygenase / tryptophan 5-monooxygenase</i> <i>activation protein, zeta polypeptide</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Características gerais do tecido muscular esquelético.....	24
2.2 Lesões musculares.....	29
2.3 Regeneração do músculo esquelético.....	31
2.4 Ácidos graxos.....	37
2.5 Efeitos dos ácidos graxos sobre a regeneração do músculo esquelético.....	39
3 OBJETIVO DO PRESENTE ESTUDO.....	45
3.1 Estratégias experimentais.....	46
3.1.1 Experimentos <i>in vivo</i>	46
3.1.2 Experimentos <i>in vitro</i>	46
4 JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO.....	48
5 HIPÓTESE.....	50
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
6.1 Animais.....	53
6.2 Parâmetros nutricionais.....	57
6.3 Indução da lesão muscular.....	59
6.4 Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas.....	60
6.5 Pesos dos músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor digital longo (EDL) e dos depósitos de gordura retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico.....	61
6.6 Força muscular (absoluta e específica), propriedades contráteis e resistência à fadiga <i>in situ</i>	61
6.7 Análise histológica.....	65
6.8 <u>Western Blotting</u>	66
6.9 Cultura de células.....	67
6.10 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR.....	68
6.11 Análise estatística.....	72
7 RESULTADOS.....	73
7.1 Efeito da suplementação diária com os ácidos linoleico e oleico durante 28	

dias após indução de lesão sobre a composição de ácidos graxos do músculo gastrocnêmio.....	74
7.1.1 A suplementação com os ácidos linoleico e oleico foi acompanhada por alterações na composição de ácidos graxos (% do total) no músculo gastrocnêmio durante a regeneração.....	74
7.1.2 Alterações na composição total de ácidos graxos monoinsaturados e no índice de dessaturação (razão oleico/ esteárico) no músculo gastrocnêmio durante a regeneração.....	77
7.1.3 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a massa do músculo gastrocnêmio nas patas lesionada e contralateral.....	78
7.1.4 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a massa dos depósitos de gordura: retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico.....	80
7.1.5 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após a indução da lesão sobre as forças isotônica e tetânica, específicas e absolutas, do músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais.....	81
7.1.6 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre as propriedades contráteis do músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais.....	83
7.1.7 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a resistência à fadiga do músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas e contralaterais.....	84
7.1.8 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas e contralaterais 28 dias após indução da lesão.....	86
7.1.9 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a área de tecido fibroso no músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas e contralaterais 28 dias após indução da lesão.....	89
7.1.10 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de desmina e vimentina no músculo gastrocnêmio das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	92
7.1.11 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de p-NF-kappaB e p-NF-kappaB/ NF-kappaB nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	93
7.1.12 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de p-44-42 MAPK e p-44-42 MAPK/ 44-42 MAPK nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	94

7.1.13 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de p-S6 e na razão p-S6/ S6 total nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	96
7.1.14 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de MuRF1 e Atrogina-1 nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	98
7.1.15 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de Pax7 e Alfa actina nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão.....	99
7.2 Efeito do tratamento in vitro de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 µM), durante a diferenciação no período de 24 horas para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD, Miogenina e Myf6.....	102
7.2.1 Efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (100 µM) em mioblastos, 24 h após indução de diferenciação.....	102
7.3 Efeito do tratamento in vitro de miotubos com os ácidos linoleico ou oleico (100 µM) do quarto ao sétimo dia (pelo período de noventa e seis horas) após indução de diferenciação para análise dos conteúdos de mRNA de desmina, vimentina e TRIM 32.....	103
7.3.1 Efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (100 µM) em miotubos já diferenciados por período de 96 h.....	103
7.4 Efeito do tratamento in vitro de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 µM) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de PCNA, ciclina D1, colágeno, fibronectina e pró-colágeno.....	104
7.4.1 Efeito do tratamento de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 µM) por 72 h sobre a proliferação celular (PCNA e ciclina D1).....	104
7.4.2 O tratamento de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 µM) por 72 h sobre a expressão de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina e pró-colágeno).	105
7 DISCUSSÃO.....	108
8 CONCLUSÃO.....	115
REFERÊNCIAS.....	118
APÊNDICE - Dados individuais.....	140

1 INTRODUÇÃO

O processo de regeneração muscular é desencadeado a partir de um estímulo lesivo que pode ser de natureza química (CONTE et al., 2008), mecânica (JARVINEN et al., 2014) ou térmica (SUGITA et al., 2012). O reparo do músculo esquelético, desencadeado após ruptura do sarcolema muscular e aumento da permeabilidade vascular, envolve eventos celulares e moleculares que se iniciam com o aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular causando proteólise dependente desse cátion, necrose do tecido danificado e ativação da resposta inflamatória no local da lesão. Essa fase é seguida pela produção de proteínas de matriz extracelular, revascularização, concomitante à ativação de células miogênicas. Essas são células satélites mononucleadas e indiferenciadas localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular, que se proliferam, se diferenciam e se fundem levando à formação de uma nova miofibrila e, assim, à reconstituição do aparato contrátil (CARLSON; FAULKNER, 1983; CHAKRAVARTHY et al., 2000; HANNAFIN et al., 1994; HORSLEY et al., 2003; HURME; KALIMO, 1992; JARVINEN et al., 2014; SERRANO et al., 2008). Vários grupos investigam estratégias terapêuticas para acelerar o processo de reparo do músculo esquelético após lesão. Há evidências de que ácidos graxos (tais como linoleico, oleico que são abundantes nas dietas ocidentais) modulam a diferenciação de células musculares (BRIOLAY et al., 2013; HURLEY et al., 2006; LEE et al., 2009; MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2013; ZHANG et al., 2012). Contudo, os efeitos da suplementação com os ácidos graxos sobre a regeneração, função contrátil e expressão de proteínas das vias de sinalização do músculo esquelético não foram devidamente estudados. Esse foi o objetivo do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do tecido muscular esquelético

O tecido muscular é constituído por células alongadas que contêm filamentos citoplasmáticos altamente organizados, responsáveis pela contração muscular. Observado ao microscópio óptico, esse tecido apresenta estriações, sendo formado por feixes de fibras musculares cilíndricas com diâmetro que varia entre 10 e 100 micrometros (LIEBER; WARD, 2013; TEN BROEK et al., 2010). Cada célula contém vários núcleos (multinucleada), que estão localizados próximo à superfície celular, sendo envolvidos por uma membrana denominada sarcolema (GREFTE et al., 2007).

Cada fibra muscular está conectada às fibras musculares adjacentes e é revestida por uma camada de tecido conjuntivo denominada endomísio. As fibras são, então, agrupadas em feixes que as mantêm unidas por outra camada de tecido conjuntivo, denominada perimísio. Este agrupamento ou feixe de fibras recebe a denominação de fascículo. Os fascículos, contendo vasos sanguíneos e tecido nervoso, são mantidos unidos por outra camada de tecido conjuntivo denominada epimísio. Os fascículos circundados por epimísio são completamente revestidos por uma resistente camada de tecido conjuntivo que recobre todo o músculo denominada fáscia, que atua como um elo de conexão entre as fibras musculares e os tendões (LIEBER; WARD, 2013; MACINTOSH et al., 2012) (Figura 1).

O citoesqueleto das fibras musculares é composto por microfilamentos (5-6 nm) como, por exemplo, a actina e a miosina responsáveis pela contração muscular; por filamentos intermediários (7-11 nm), por exemplo, desmina e vimentina que dão rigidez e elasticidade à célula, além de regular a transcrição; e por microtúbulos (20-25 nm) como, por exemplo, a tubulina responsável pela estrutura e transporte intracelulares (FERRANTE et al., 2011; TEN BROEK et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1: **Estrutura simplificada do músculo estriado esquelético.** O músculo estriado esquelético está conectado a ossos por meio de tendões. O epimísio envolve todo o tecido muscular. O perimísio reveste os fascículos e cada fibra muscular é circundada pelo endomísio, o qual é composto pela lâmina basal onde estão ancoradas as células-satélites. Células multinucleadas, as fibras do músculo esquelético são compostas por mitocôndrias responsáveis pela respiração celular. Cada miofibrila apresenta estriações (bandas A e I, zonas H e linhas Z) devido ao aparato contrátil que a compõe. O citoesqueleto é composto por microfilamentos (actina e miosina) responsáveis pela contração muscular; filamentos intermediários (desmina e vimentina) que formam o arcabouço da célula; e microtúbulos responsáveis pelo transporte intracelular (Modificada de RELAX; ZAMMIT, 2012).

Resumidamente, a despolarização gerada pelo impulso elétrico na placa motora terminal ou junção neuromuscular é conduzida para o interior da célula por meio de invaginações que envolvem as junções das bandas A e I no músculo estriado esquelético. Essas invaginações compõem o sistema de túbulos transversos (túbulos T). A despolarização dos túbulos T desencadeia a abertura dos canais de cálcio, promovendo a liberação deste íon a partir do retículo sarcoplasmático para o citoplasma (Figura 2A). O cálcio então liga-se à troponina.

Essa proteína é constituída por três polipeptídeos: troponina T, que se liga à tropomiosina; troponina I, que se liga à actina e inibe a sua interação com a miosina; e a troponina C, que se liga ao cálcio liberando o sítio de ligação da actina à miosina, formando as pontes cruzadas (ligação da cabeça da miosina à actina), seguidos da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), encurtamento dos sarcômeros e a contração muscular (Figura 2C). Quando o impulso nervoso é interrompido, o cálcio é removido pela bomba de cálcio para ser novamente armazenado no retículo sarcoplasmático e os microfilamentos assumem a posição original (MACINTOSH et al., 2012; SCHOENFELD, 2010; TEN BROEK et al., 2010).

Figura 2: **Esquema simplificado dos eventos que desencadeiam a contração do músculo esquelético.** A contração das fibras musculares esqueléticas é estimulada por fibras nervosas motoras. A membrana plasmática conduz a despolarização para o interior das células por meio dos túbulos T, promovendo a abertura dos canais de cálcio com a consequente saída desse íon para o citoplasma (A). A troponina é constituída por três subunidades: troponina C, que se liga ao cálcio liberando o sítio de ligação da actina à miosina para formação das pontes cruzadas (B); troponina T, que se liga a tropomiosina; e a troponina I, que se une à actina e inibe a sua interação com a miosina. A quebra da adenosina trifosfato (ATP) faz com que a cabeça da miosina tracione a actina, promovendo deslizamento entre os filamentos finos e grossos e consequente encurtamento dos sarcômeros (C) (Modificada de OLIVEIRA, 2013).

A matriz extracelular proporciona o suporte estrutural do músculo estriado esquelético. Desempenha função importante na manutenção estrutural dos tecidos e desenvolvimento da força de contração (LIEBER; WARD, 2013). É formada por componentes protéicos fibrosos, como por exemplo, o colágeno, fibronectina, laminina, elastinas e integrinas. Os proteoglicanos têm a função de dar rigidez a matriz, resistindo à compressão. Ancorados a membrana, podem se ligar a fatores de crescimento e a outras proteínas, servindo como sinal para as células. O

colágeno, sintetizado pelos fibroblastos, é a proteína mais abundante que compõe a matriz extracelular. Fibronectina e laminina encontram-se ancoradas à membrana plasmática, ligando-se a fatores de crescimento e outras proteínas, participando nas interações célula-célula. As integrinas são proteínas de adesão presentes na membrana celular. As elastinas, em contraste com o colágeno, proporcionam elasticidade aos tecidos. Juntas, as proteínas que compõem a matriz extracelular constituem suporte mecânico para vasos sanguíneos e nervos; garantem resistência e elasticidade aos tecidos e permitem o transporte de sinais e nutrientes para as interações célula-célula (LIEBER; WARD, 2013; SHEN et al., 2011) (Figura 3). Em algumas doenças, como por exemplo nas distrofias, ocorre aumento da síntese de colágeno e espessamento da área de matriz extracelular, com consequente fibrose e perda de função contrátil do músculo esquelético (LIEBER; WARD, 2013; MACINTOSH et al., 2012; SAKUMA et al., 2014).

Figura 3: **Estrutura simplificada dos componentes que formam a matriz extracelular do músculo esquelético.** A matriz extracelular possui função importante na integração célula-célula e célula-tecido. Além disso, controla múltiplas funções tais como: proliferação celular, manutenção estrutural e mecânica dos tecidos e transmissão de força no músculo esquelético. É principalmente composta por colágeno, elastinas, integrinas, proteoglicanos e glicoproteínas, como a fibronectina e laminina. O colágeno e a elastina formam o arcabouço fibroso do tecido conectivo, enquanto que os proteoglicanos e glicoproteínas preenchem o interstício e constituem a interface entre a célula e a matriz extracelular (Modificada de <http://www.autoimmunity-bible.com>).

2.2 Lesões musculares

O processo de regeneração muscular é estudado em diferentes modelos experimentais de lesão, utilizando técnicas histológicas e imunoistoquímica, determinação do conteúdo de mRNA por RT-PCR e de marcadores proteicos específicos de miogênese e fibrogênese por *western blotting*, além dos testes de função contrátil (BORNEMANN; SCHMALBRUCH, 1992; BROCKS et al., 1991; HURME et al., 1991; HURME; KALIMO, 1992; LI et al., 2007; MENETREY et al., 1999; NEGISHI et al., 2005; STRATOS et al., 2007).

A musculatura esquelética sofre lesões por trauma direto, como em atividades físicas intensas, ou lacerações decorrentes de acidentes, ou por causas indiretas, como disfunções neurológicas ou defeitos genéticos inatos. Quando não reparadas, as lesões podem levar à perda de massa muscular e deficiência de locomoção. A manutenção da musculatura esquelética é conferida pela sua notável capacidade de se regenerar. Em resposta à lesão muscular, ocorre reinervação, revascularização e reparo do aparato contrátil (RUDNICKI et al., 1993).

Atletas que sofrem lesão muscular por laceração tornam-se incapacitados por períodos longos de tempo e suas carreiras profissionais são muitas vezes interrompidas. A recuperação muscular, após laceração, é lenta e muitas vezes incompleta (GARRETT et al., 1984; MENETREY et al., 1999), levando a danos permanentes e hipofunção (CHAN et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2001; GARRETT et al., 1984; KÄÄRIÄINEN et al., 1998; MENETREY et al., 1999). Conforme observado no presente estudo e em outros, um mês após a indução de lesão (laceração), a geração de força no músculo regenerado é menor que a observada no músculo contralateral (não lesionado) (CHAN et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2001; MENETREY et al., 1999).

A proliferação de fibroblastos é importante na reconstituição da matriz extracelular em músculos esqueléticos lacerados. Contudo, a proliferação de fibroblastos pode levar à formação excessiva de tecido cicatricial, resultando em recuperação incompleta da função do músculo esquelético (BEST; GARRETT, 1994; BISCHOFF, 1994; HURME et al., 1991; JÄRVINEN; SORVARI, 1975)

O objetivo inicial do presente estudo foi o de estabelecer um modelo experimental de lesão muscular em ratos *Wistar* a partir de outro utilizado em camundongo. Nos modelos de laceração por corte completo ou parcial, conforme citado na Tabela 1, os pesquisadores realizaram secção no ventre muscular, variando em extensão e profundidade. Observa-se nesses estudos mais uniformidade entre os modelos de lesão por laceração em comparação com aqueles de deformação e de contusão.

Tabela 1: Modelos de injúria por laceração

Animal	Músculo	Tipo de Laceração	Referência
Camundongos	Gastrocnêmio	Secção Completa	SATO et al., 2003 PEREIRA et al., 2012
Ratos Sprague – Dawley	Sóleo	Secção Completa	KAARIANEN et al., 1998 VAITTINEN et al., 2002 AARIMAA et al., 2004
Camundongos	Tibial Anterior	Secção Parcial	NEGISHI et al., 2005
Camundongos	Gastrocnêmio	Secção Parcial	MENETREY et al., 1999 MENETREY et al., 2000 LI; HUARD, 2002 LI et al., 2004 SHEN et al., 2005 KAAR et al., 2008 CHAN et al., 2010 PARK et al., 2012 HWANG et al., 2013
Ratos Sprague - Dawley	Gastrocnêmio	Secção Parcial	FOSTER et al., 2003 HWANG et al., 2006 FREITAS et al., 2007
Ratos <i>Wistar</i>	Gastrocnêmio	Secção Parcial	PIEPADE et al., 2008
Cão	Quadríceps	Secção Parcial	TURNER et al., 2012

2.3 Regeneração do músculo esquelético

Até meados do século 19, acreditava-se que o músculo esquelético não se regenerava (MAZANET; FRANZINI-ARMSTRONG, 1986). Mais de um século depois, observou-se que, em determinadas circunstâncias, a lesão muscular por si só induz a formação de novas fibras (MAZANET; FRANZINI-ARMSTRONG, 1986). Ainda assim as bases celulares da regeneração do músculo esquelético permaneciam por serem elucidadas. Alexandre Mauro, em 1961, identificou uma pequena população de células mononucleadas, localizadas na periferia da miofibrila. Essas células foram denominadas de células satélites devido a localização sob a lâmina basal em íntima associação com a membrana plasmática do músculo esquelético. Nesse trabalho, discutiu-se também a origem e a função dessas

células. Algumas hipóteses foram formuladas por Mauro: (1) as células satélites seriam ativadas nos traumas, isquemia, compressão mecânica e por agentes tóxicos; (2) As células seriam resquícios do desenvolvimento embrionário de células multinucleadas e resultantes do processo de fusão de mioblastos; (3) Seriam células circulatórias que se agrupariam entre as membranas basal e plasmática, sendo recrutadas em condições específicas, tais como durante o processo de crescimento muscular e regeneração. A partir de tais hipóteses formuladas por Mauro, muitos estudos passaram a ser realizados para elucidar a origem e função dessas células miogênicas.

Cheek et al. (1965) e Winick e Noble (1966) demonstraram que o crescimento pós-natal e a hipertrofia da fibra muscular são acompanhados de aumento marcante do conteúdo de DNA. Moss (1968) observou que a adição de núcleos às fibras musculares está intimamente relacionada à extensão do crescimento muscular. Apesar desses estudos, contudo, até a década de 70, pouco se sabia sobre a proliferação, diferenciação e fusão das células satélites.

Durante o reparo do músculo esquelético, as células indiferenciadas se proliferam e se alinham na periferia da fibra muscular danificada (BENTZINGER et al., 2010). Com a progressão da regeneração, progenitores miogênicos não maduros são substituídos por mioblastos maduros (ALLBROOK, 1962). Em estágios tardios de reparo do músculo esquelético, há células indiferenciadas associadas às fibras regeneradas (SHAFIQ; GORYCKI, 1965). Bischoff (1994) e Konigsberg et al. (1975) observaram que as células satélites possuem muitas características comuns às células miogênicas de origem embrionária. Dessa forma, essas células possuem a capacidade de proliferar e fundir-se para formar miotubos, armazenando proteínas musculares específicas (ALLEN et al., 1985; COSSU et al., 1980). A substituição de fibras musculares lesionadas é dependente de células satélites que estão normalmente quiescentes. A lesão do tecido leva à ativação, proliferação, diferenciação e fusão dessas células para formar novas fibras. Contudo, a capacidade de reparar o dano nos tecidos é modificada pela extensão e tipo de lesão e pela interação com mediadores celulares (BENTZINGER et al., 2010).

A miogênese envolve a proliferação de mioblastos, seguida de modificações morfológicas, bioquímicas e moleculares que resultam na formação de miotubos multinucleados (CHARGE; RUDNICKI, 2004; PERRY; RUDNICKI, 2000). A diferenciação de mioblastos se inicia com a expressão sequencial de fatores

regulatórios da miogênese e expressão de proteínas contráteis em miofibras (CHARGE; RUDNICKI, 2004).

Davis et al. (1987) identificaram o fator *basic helix-loop-helix* (bHLH) *MyoD* que é um dos primeiros marcadores do processo de miogênese. O *MyoD* é expresso em células satélites ativadas mas não em células quiescentes. Posteriormente, mais três fatores foram identificados: miogenina (EDMONDSON; OLSON, 1989; WRIGHT et al., 1989), *MRF4* (*myogenic regulatory factor 4*), também conhecido como *Myf6* ou *herculin* (BRAUN et al., 1990a; MINER; WOLD, 1990; RHODES; KONIECZNY, 1989), e *Myf5* (*myogenic factor 5*) (BRAUN et al., 1989), membros da super família de fatores de transcrição bHLH. Estes fatores são específicos para o músculo esquelético, sendo expressos em momentos distintos durante a miogênese. São altamente conservados e expressos coletivamente no músculo esquelético, sendo referidos como fatores regulatórios da miogênese (MRFs). Embora seja um dos marcadores de mioblastos, camundongos mutantes para *MyoD* não apresentam comprometimento marcante da miogênese. Esse fato é explicado pela redundância nas funções de *MyoD* e *Myf5*. Contudo, a combinação de ambos é fundamental para o sucesso da miogênese. A miogenina, também conhecida por MyoG, pertence a família dos fatores que regulam a miogênese. Requerida para fusão de mioblastos e reparo do músculo esquelético, é expressa durante a formação de miócitos na diferenciação terminal (Figura 4).

Figura 4: **Hierarquia dos fatores regulatórios da progressão da diferenciação miogênica.** No músculo esquelético de animais adultos, células satélites expressam o fator de transcrição *paired-box 7* (*Pax7*) que permanece quiescente em condições normais. Células satélites possuem a habilidade de se auto renovar, expandir, proliferar, se diferenciar e se fundir para restaurar o tecido do músculo esquelético danificado. A ativação de progenitores musculares (células satélites) em mioblastos envolve aumento da expressão dos fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH) *myogenic factor 5* (*Myf5*) e *myoblast determination* (*MyoD*). A miogenina ou *MyoG* é um fator de transcrição essencial para a miogênese e reparo do músculo esquelético. Expresso durante a formação de miócitos pela fusão de mioblastos. Os fatores de transcrição miogenina e *myogenic factor 6* (*Myf6*) são ativados durante a diferenciação terminal de mioblastos e formação de miócitos e miotubos. (Figura modificada de WANG; RUDNICKI, *Nature Reviews / Molecular Cell Biology*, 2011).

O rompimento do sarcolema muscular provoca aumento da permeabilidade vascular e infiltração de citocinas e de fatores de crescimento, como o fator de necrose tumoral (TNF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF beta). Estes fatores promovem a entrada de mioblastos em proliferação e diferenciação. A expansão de progenitores fibro adipogênicos (FAPs) residentes no músculo também geram a diferenciação terminal de mioblastos. Estas células (FAPs) estão localizadas no interstício muscular e não possuem potencial miogênico, mas adipogênico e fibrogênico. Estas células contribuem ativamente para a formação de um microambiente favorável para a proliferação e diferenciação de células-tronco satélites (JOE et al., 2010). Fibroblastos, além da síntese de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e glicoproteínas multiadesivas que fazem parte da matriz extracelular, estão envolvidos na produção de fatores de crescimento que controlam o crescimento e a diferenciação de células-tronco satélites (AGLEY et al., 2013; BENTZINGER et al., 2010) (Figura 2).

Figura 5: **Esquema simplificado das interações celulares que ocorrem durante a regeneração muscular.** Durante a regeneração, sinais parácrinos provenientes das fibras necrosadas regulam a infiltração de macrófagos, liberando citocinas que ativam células-tronco satélites e induzem a entrada de mioblastos (células representadas na cor rosa) em proliferação e diferenciação. A expansão de progenitores fibroadipogênicos (FAPs) residentes no músculo esquelético também promovem a diferenciação terminal de mioblastos. Contudo, nem todos os sinais são pró-miogênicos. Fibroblastos e células vasculares secretam moléculas que promovem o retorno de células-tronco satélites ao estado quiescente. Fibroblastos previnem ainda a diferenciação inicial e, reciprocamente, o aumento do conteúdo de mioblastos pode promover a proliferação de fibroblastos. Resumidamente, o músculo esquelético possui a capacidade de iniciar um processo rápido de reparo da lesão, evitando a perda de massa muscular. A regeneração do músculo esquelético envolve a ativação de várias respostas celulares, dentre elas, a ativação de células-satélites é um elemento essencial nesse processo. IL-6, Interleucina-6; *TGFβ*, transforming growth factor; *TNFα*, tumour necrosis factor. (Adaptado de WANG; RUDNICKI, *Nature Reviews / Molecular Cell Biology*, 2011).

2.4 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são moléculas orgânicas constituídas de carbono, hidrogênio e oxigênio, contendo um grupamento carboxila terminal. Apresentam normalmente cadeias pares variando de 14 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos de origem animal tem frequentemente de 16 a 18 átomos de carbono. São constituintes da molécula de gordura mais abundante do organismo e da nossa dieta, os triglicerídeos ou triacilgliceróis. Os ácidos graxos são também componentes importantes das membranas celulares como componentes dos fosfolipídeos. Além de componentes da estrutura das células de mamíferos, os ácidos graxos são substratos energéticos importantes do organismo. A oxidação de ácidos graxos gera mais ATP que a de glicose e contribui substancialmente para a manutenção da função das células que apresentam mitocôndrias (CURI et al., 2009).

De acordo com o tamanho da cadeia carbônica, os ácidos graxos são classificados como de cadeias curta (de 2 a 4 átomos de carbono), média (de 6 a 14 átomos de carbono) e longa (acima de 16 átomos de carbono). Com relação à presença ou não de duplas ligações na cadeia carbônica, os ácidos graxos são classificados como saturados (que não tem dupla ligação) ou insaturados (que apresentam uma ou mais duplas ligações na molécula). Os insaturados são classificados como monoinsaturados (apresentam uma única dupla ligação na molécula) e poliinsaturados (apresentam duas ou mais duplas ligações na molécula). De acordo com a posição da última dupla ligação, em relação ao terminal metil, os ácidos graxos poliinsaturados são classificados como n ou ω 9 ($n-9$ ou $\omega-9$), 6 ($n-6$ ou $\omega-6$) ou 3 ($n-3$ ou $\omega-3$) (CURI et al., 2009) (Figura 6).

A Ácido Linoleico

B Ácido Oleico

Figura 6: **Esquema simplificado da fórmula molecular dos ácidos linoleico (A) e oleico (B) utilizados neste estudo.** O ácido linoleico é um ácido graxo de cadeia longa, poliinsaturado, pertencente a família ômega-6 com 18 átomos de carbonos, duas duplas ligações e fórmula molecular $C_{18}H_{32}O_2$. O ácido oleico é um ácido graxo de cadeia longa, monoinsaturado, pertencente à família ômega-9 com 18 átomos de carbonos, uma dupla ligação na sua estrutura e fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_2$. (modificado de <http://www.schoolscience.com>).

Os ácidos graxos podem ser obtidos da dieta ou sintetizados no organismo a partir da glicose, pela via de síntese *de novo*, por meio da atividade da ácido graxo sintetase presente no citoplasma das células. A glicose por meio da via glicolítica gera piruvato que é convertido em acetil-CoA na mitocôndria por reação catalisada pela piruvato desidrogenase. O acetil-CoA se condensa com o oxalacetato e forma citrato pela reação catalisada pela citrato sintase. O citrato é transportado da mitocôndria para o citoplasma onde é convertido em acetil-CoA pela ação da ATP-citrato liase. O acetil-CoA gerado no citoplasma é o precursor dos ácidos graxos e esta via metabólica é chamada de síntese *de novo*.

O ácido oleico [18:1 (ω 9)] é um ácido graxo monoinsaturado ω 9 enquanto que o ácido linoleico [18:2 (ω 6)] é um ácido graxo poliinsaturado ω 6, ambos são abundantes na dieta ocidental. Os ácidos graxos são armazenados nas células como triacilgliceróis e incorporados em fosfolípidos de membrana (CALDER et al., 2009). Quantidades excessivas de ácidos graxos ω -6 e o conseqüente aumento na relação ω -6/ ω -3 estão envolvidos na patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, cardiovasculares e câncer (SIMOPOULOS, 2008).

Nos países ocidentais, a ingestão per capita diária de lipídios é de 35- 40% do consumo energético total (RISÉRUS, 2009). A quantidade pode variar entre 20 a 100 g por dia. A composição dos ácidos graxos nos alimentos varia consideravelmente nos diferentes países devido a diferenças na origem das gorduras das dietas (CALDER et al., 2009).

A dieta dos povos do Mediterrâneo é rica em óleo de oliva, que contém muito ácido oleico, e está associado à redução no risco de doenças cardiovasculares e diabetes (LÓPEZ-MIRANDA et al., 2010). Contudo, há controvérsias sobre os nutrientes responsáveis pelos efeitos observados. Os principais candidatos são o ácido oleico e os agentes antioxidantes (compostos fenólicos) presentes no óleo de oliva extra virgem (DE LORGERIL et al., 2013). A ingestão de ácido oleico é elevada em diversas populações, sendo o segundo ácido graxo mais consumido no mundo (UNITED STATES THE DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2008). O ácido oleico não é essencial, uma vez que pode ser sintetizado pelo organismo (MOUSSA et al., 2000). O ácido linoleico, por sua vez, é essencial para o desenvolvimento saudável dos seres humanos. Este ácido graxo não pode ser sintetizado pelo organismo humano e, portanto, deve ser fornecido por meio da dieta (HARDEN et al., 2014; HLAIS et al., 2013; SIMOPOULOS, 2008). Quimicamente, o ácido linoleico é um ácido carboxílico com uma cadeia de 18 átomos de carbonos e duas ligações duplas *cis*, estando a primeira dupla ligação localizada no sexto carbono a partir da extremidade metila. O ácido linoleico é precursor da síntese de ácido araquidônico (AA), bem como algumas prostaglandinas. Encontrado em lípidos de membrana celular, o ácido linoleico é abundante em muitos óleos vegetais, como por exemplo sementes de papoia, açafrão, girassol, soja, algodão e milho, (UNITED STATES THE DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2008).

2.5 Efeitos dos ácidos graxos sobre a regeneração do músculo esquelético

Alguns ácidos graxos, como os ácidos oleico e linoleico, exercem efeito pró-proliferativo no músculo liso vascular (LUO et al., 2005; RAO et al., 1995), podendo regular o crescimento muscular (KELLEY et al., 2006). No entanto, há poucos trabalhos sobre o envolvimento dos ácidos graxos na miogênese *in vitro* e não há estudo envolvendo ácidos graxos e a regeneração do músculo esquelético *in vivo*. Alguns nutrientes, incluindo leucina e creatina, estimulam a miogênese (DELDICQUE et al., 2007; KIMBALL et al., 1999). Perdiconi e colaboradores (1992) observaram aumento no conteúdo total de fosfolípidos durante a diferenciação muscular. Os mioblastos sintetizam predominantemente triacilgliceróis, enquanto que os miotubos produzem fosfolípidos (SAURO; STRICKLAND, 1987). A fusão de mioblastos também pode ser regulada por fatores que alteram a fluidez da

membrana plasmática tais como temperatura e composição lipídica (PINHEIRO, 2012; PRIVES; SHINITZKY, 1977; VAN DER BOSCH et al., 1973).

A composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos determina as propriedades físico químicas da membrana plasmática e em grande parte sua assimetria, fluidez, plasticidade, organização e ocorrência de microdomínios (ABBOTT et al., 2010). A composição de ácidos graxos da membrana plasmática pode ser modificada por alteração no consumo de lipídios da dieta, como por exemplo a substituição de ácidos graxos saturados por poliinsaturados ômega 3 ou 6. A incorporação desses ácidos graxos nos fosfolipídeos de membrana afeta, além das propriedades físicas já citadas, também as interações lipídio-proteínas na membrana (ABBOTT et al., 2010; LIU et al., 1994; STARK et al., 2007). Por exemplo, a diminuição da sensibilidade à insulina no músculo esquelético está associada ao decréscimo da proporção de ácidos graxos poliinsaturados em fosfolipídeos de membrana (BORKMAN et al., 1993).

Há evidências da importância dos produtos intermediários do metabolismo dos ácidos graxos na sobrevivência (JANSEN et al., 2008), proliferação (BONDESEN et al., 2006; MENDIAS et al., 2004; OTIS et al., 2005; SHEN et al., 2005), diferenciação (MENDIAS et al., 2004; SHEN et al., 2005; VELIÇA et al., 2010) e fusão (BONDESEN et al., 2007; HORSLEY; PAVLATH, 2003; MENDIAS et al., 2004; SHEN et al., 2006) de mioblastos. Rodeman e pesquisadores (1982) sugeriram que metabólitos lipídicos derivados dos ácidos graxos poliinsaturados aceleram a síntese proteica, fusão e crescimento de células musculares em diferentes espécies animais (DAVID; HIGGINBOTHAM, 1981; ENTWISTLE et al., 1986; MCLENNAN, 1987; OTIS et al., 2005).

A oxidação de ácidos graxos é significativamente mais elevada em miotubos do que em mioblastos, sendo a biogênese mitocondrial necessária para a diferenciação em músculo esquelético (DUGUEZ et al., 2002; JAHNKE et al., 2008; SAURO; STRICKLAND, 1987). O conteúdo de triacilgliceróis diminui em mais de 50% durante a miogênese (PERDICONI et al., 1992) e a inibição da respiração mitocondrial compromete a diferenciação miogênica e a formação de miotubos (HAMAIN et al., 1997; HERZBERG et al., 1993). Camundongos ob/ob (deficientes em leptina), com concentrações elevadas de ácidos graxos no plasma, apresentam regeneração muscular deficiente (NGUYEN et al., 2011). A dieta hiperlipídica

compromete a regeneração muscular em camundongos (HU et al., 2010), possivelmente, pelo efeito de ácidos graxos saturados.

Nosso grupo observou aumento da síntese dos ácidos oleico e araquidônico durante a miogênese *in vitro*. A adição dos ácidos araquidônico e linoleico ao meio de cultura aumentou a proliferação das células tronco musculares, avaliada pela incorporação de timidina marcada no carbono 14. Foi investigado também o efeito do tratamento de camundongos distróficos (*mdx*) com ácido linoleico por 20 dias. Observou-se que a suplementação com este ácido graxo melhora significativamente a força do músculo gastrocnêmio desses animais, sugerindo um possível efeito trófico (PINHEIRO, 2012).

A influência de alguns componentes da matriz extracelular (por exemplo, colágeno) na ativação de células tronco satélites ainda é pouco compreendida. Contudo, acredita-se que proteínas de matriz modulam a sinalização *Wnt7a* e aumentam o *pool* de células tronco satélites durante a regeneração do músculo esquelético (BENTZINGER et al., 2013). O envolvimento de ácidos graxos na expressão das proteínas de citoesqueleto e de matriz extracelular no músculo esquelético, *in vitro* e *in vivo*, é ainda desconhecido.

Em 1978, Horwitz e colaboradores observaram que os ácidos linoleico e oleico, quando adicionados ao meio de cultura, apresentam efeito estimulatório sobre a fusão de mioblastos embrionários. Os autores observaram a influência da composição lipídica da membrana na proliferação e fusão de mioblastos formandomiotubos multinucleados. Em 1985, Allen e colaboradores investigaram o efeito do tratamento de células miogênicas com ácido linoleico e insulina. Os autores observaram que ambos estimulavam a diferenciação de células satélites por meio da regulação da fusão de mioblastos *in vitro*. A incubação das células com o ácido linoleico (1 µg/mL), em meio contendo 1 % de soro de cavalo, elevou o grau de diferenciação e fusão de células satélites, contudo, sem causar aumento notável no número de células. Os autores também observaram que a presença de agentes mitogênicos no meio de cultura e a resultante proliferação das células preveniam a diferenciação.

Lu et al. (1998) e Rao et al. (1995) observaram que os ácidos linoleico e oleico, adicionados ao meio de cultura, induzem proliferação de músculo liso vascular. O ácido oleico induziu proliferação de modo mais pronunciado que o linoleico por ativação da protein kinase C (PKC). Pariza et al. (2001) demonstraram

in vivo que a suplementação com o ácido linoleico conjugado (0,3 % da dieta) causa decréscimo da massa de gordura e aumento de massa magra livre de gordura em roedores.

Hurley et al. (2006) compararam o efeito de diferentes ácidos graxos sobre a diferenciação de mioblastos L6 *in vitro*. Para avaliar o grau de diferenciação, os autores quantificaram os conteúdos de proteína e DNA e a atividade da creatina quinase (CK/DNA). Os efeitos sobre a diferenciação foram acompanhados de análise da atividade dos receptores PPAR alfa e gama a fim de se estabelecer uma possível associação desses fatores de transcrição com o processo de diferenciação de mioblastos L6. O ácido linoleico estimulou a diferenciação em baixas concentrações (50 μ M). Por sua vez, o ácido oleico estimulou a diferenciação em todas as concentrações testadas (0, 12,5, 25, 50 e 100 μ M). Os autores concluíram que os mecanismos de diferenciação parecem não envolver os PPARs.

Lee et al. (2009) investigaram o efeito dos ácidos graxos sobre a proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12 e o possível envolvimento da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) nesse processo. Os ácidos linoleico e oleico aumentaram a proliferação e diferenciação das células. A fosforilação da *extracellular signal regulated kinase* (ERK 1/2) e *c-jun-N-terminal kinase* (JNK) ocorreu durante a proliferação, mas não de JNK durante a diferenciação.

Markworth e Cameron-Smith (2013) avaliaram o efeito do tratamento com ácido araquidônico em mioblastos C2C12. Os pesquisadores observaram que o ácido araquidônico estimula o crescimento dos mioblastos de maneira dose dependente nas concentrações de 0; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 μ M. Houve aumento de mionúcleos durante a miogênese independente das mudanças na densidade celular ou extensão da diferenciação miogênica. Para verificar o efeito do tratamento com ácido araquidônico sobre a hipertrofia em miotubos, os autores incubaram os mioblastos C2C12 em meio de diferenciação por 72 horas. Após este período, o ácido araquidônico (25 μ M) foi adicionado ao meio contendo os miotubos já diferenciados. Os pesquisadores verificaram que a hipertrofia foi maior nos miotubos tratados com o ácido araquidônico quando comparados com células não tratadas.

Briolay et al. (2013) mostraram que os ácidos (20 μ M) oleico (18:1 n-9), araquidônico (20:4 n-6), eicosapentaenoico (EPA) (20:5 n-3) e docosaexaenoico (DHA) (22:6 n-3) estimulam a diferenciação miogênica de mioblastos L6. Esses

ácidos graxos alteram a composição de lipídeos da membrana e ainda durante a diferenciação miogênica promovem fosforilação de p70S6K1 e ativação da mTORC1 (importante regulador do ciclo celular e síntese de proteínas), sem alteração da fosforilação da AKT (regulador do metabolismo celular). Estes resultados suportam a proposição de que a composição de ácidos graxos da membrana plasmática pode controlar a atividade das complexas vias de sinalização da diferenciação miogênica.

Dieta rica em ácido graxo saturado e ácido linoleico causa resistência à insulina e desequilíbrio dos componentes oxidativos no músculo esquelético, ocasionando estresse oxidativo (HOLNESS et al., 2000; STORLIEN et al., 1986). O tratamento de mioblastos isolados com ácido araquidônico estimula o *turnover* protéico (síntese e degradação) rápido (RODEMAN; GOLDBERG, 1982; SMITH et al., 1983).

Conforme mencionado acima, alguns pesquisadores investigaram o efeito do tratamento com ácidos graxos em células de linhagem (mioblastos C2C12 e L6), células já pré-diferenciadas e comprometidas com a linhagem miogênica *in vitro*. Há também estudos *in vivo* com evidências indiretas dos efeitos dos lipídios na fisiologia muscular. Contudo, há ainda muito a ser investigado e esclarecido sobre os ácidos graxos e a regeneração muscular, em particular com relação aos efeitos *in vivo*.

O processo de reparo que se segue ao dano do tecido muscular envolve ações coordenadas de vários tipos celulares em resposta a sinais locais e sistêmicos. Após um dano muscular agudo, o infiltrado de células inflamatórias e as células-tronco residentes (células satélites) orquestram suas atividades para restaurar a estrutura do tecido (BENTZINGER et al., 2010; CHARGE; RUDNICKI, 2004; WANG; RUDNICKI, 2011). No entanto, durante o dano tecidual crônico (experimentalmente três a quatro semanas), tal como ocorre nas lacerações, a ativação de fibroblastos persistem, enquanto que a capacidade reparadora das células satélites se reduz. Nesse cenário, a reparação muscular deficiente e a substituição do tecido contrátil por tecido fibroso e gordura (degeneração gordurosa) corresponde ao seu estágio final (CHAN et al., 2010; HWANG et al., 2013; PARK et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; PIEDADE et al., 2008; TURNER et al., 2012)

Há várias evidências da ação dos ácidos graxos sobre a função de diversos tipos celulares. Entretanto, não há ainda evidência da modulação da resposta fibrótica no músculo esquelético. Por outro lado, não há também indicação de dieta ou suplementação nutricional que comprovadamente pode alterar o curso das

miopatias que acompanham os quadros de regeneração incompleta, fibrose excessiva e perda de função contrátil.

3 OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO

Investigar os efeitos da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a morfologia, conteúdo de proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular e função contrátil durante a regeneração do músculo gastrocnêmio lacerado em ratos e associar esses achados aos efeitos dos ácidos graxos sobre mioblastos, miotubos e fibroblastos em cultura.

3.1 Estratégias experimentais

3.1.1 Experimentos in vivo

Avaliar o efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (0,44 g por Kg de peso corpóreo) por quatro semanas sobre a regeneração do músculo gastrocnêmio lacerado em ratos. As determinações realizadas seguem listadas:

- *Análise da composição (% do total) de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio;*
- *Avaliação da função contrátil (forças isotônica e tetânica, específicas e absolutas, propriedades contráteis e resistência à fadiga);*
- *Análise da massa do músculo gastrocnêmio;*
- *Determinação das áreas de secção transversa de miofibras e de tecido fibroso (análise histológica);*
- *Análise molecular (por western blotting) dos conteúdos de desmina, vimentina, p-44/42 MAPK, p-NF-kappaB, p-S6, MuRF1, atrogina-1, Pax-7 e alfa-actina.*

3.1.2 Experimentos in vitro

Determinar os efeitos dos ácidos linoleico e oleico (100 µM) sobre mioblastos, miotubos e fibroblastos em cultura. As determinações realizadas seguem listadas:

- *Análise do tratamento de células-tronco satélites (mioblastos), durante a diferenciação por período de 24 horas, para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD, Miogenina e Myf6*
- *Avaliação do tratamento de miotubos, já diferenciados, por período de 96h para análise dos conteúdos de mRNA de desmina, vimentina e TRIM 32*

- *Análise do tratamento de fibroblastos por período de 72h para análise da expressão de mRNA de PCNA, ciclina D1, colágeno, fibronectina e pro-colágeno*

***4 JUSTIFICATIVA PARA
REALIZAÇÃO DESTE
ESTUDO***

Estratégias terapêuticas tem sido investigadas na perspectiva de melhorar a capacidade regenerativa do músculo esquelético após lesão. Há várias evidências da ação modulatória dos ácidos graxos (linoleico ou oleico) na função muscular e trofismo. Em nosso laboratório, observamos que durante a miogênese *in vitro* ocorre diminuição do conteúdo total de ácidos graxos saturados (esteárico e palmitato) e aumento do conteúdo total de ácidos graxos monoinsaturados (oleico e palmitoleico), acompanhado por elevação do índice de atividade da delta-9-dessaturase. *In vitro*, antes da indução de diferenciação, o tratamento com ácido oleico diminuiu a proliferação de células-tronco satélites. Em estudo também realizado pelo grupo, foi observado que a administração oral dos ácidos linoleico e oleico aceleram o processo de cicatrização em ratos. O presente trabalho é o primeiro a investigar o efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a morfologia, conteúdo de proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular e função contrátil durante a regeneração do músculo gastrocnêmio lacerado em ratos. Os mecanismos envolvidos foram investigados durante a diferenciação de células miogênicas e proliferação de fibroblastos. Para isso, os efeitos dos ácidos linoleico ou oleico sobre mioblastos, miotubos e fibroblastos foram estudados em cultura.

5 HIPÓTESE

A administração oral dos ácidos linoleico ou oleico podem acelerar o processo de regeneração muscular após uma lesão extensa, como a laceração.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando entre 182 à 206 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente de 23 °C, 12/12 h ciclo claro/escuro, ração e água a vontade. Os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP, protocolo número 78.

Os animais foram divididos em três grupos: (1) animais que receberam óleo mineral (100%, Tayuyana Ltda, Nova Odessa, SP); (2) suplementados com ácido linoleico (18:2 ω -6; $\geq$ 99%, Sigma L1376, St. Louis, MO, EUA) ou (3) suplementados com ácido oleico (18:1 ω -9; $\geq$ 99%, Sigma L1381, St. Louis, MO, EUA) por gavagem (0,44 g/kg de peso corporal), diariamente, por vinte e oito dias. O consumo de ração (g/dia) e a massa corporal (g) dos animais foram avaliados semanalmente. Os protocolos experimentais A (*in vivo*) e B (*in vitro*) estão resumidos na Figura 7 e descritos a seguir.

No protocolo A avaliou-se o efeito da suplementação com os ácidos linoleico ou oleico por 28 dias sobre os músculos gastrocnêmios lesionado e contralateral. Os seguintes parâmetros foram determinados: composição de ácidos graxos no músculo gastrocnêmio, massa dos músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor digital longo (EDL), massa dos depósitos de gordura (retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico), força muscular (absoluta e específica), propriedades contráteis, resistência à fadiga *in situ*, área de secção transversa das fibras pelo método de hematoxilina e eosina (HE), a área de tecido fibroso (colágeno) pelo método *Picro Sirius Red* e conteúdo de proteínas das vias de sinalização (*Desmina*, *Vimentina*, *Pax7*, *MuRF1*, *Atrogina-1*, *fosfo-44/42 MAPK*, *44/42 MAPK*, *fosfo-S6 Ribossomal*, *S6 Ribossomal*, *fosfo-NF-kappaB*, *NF-kappaB* e *Alfa actina*) pelo método *western blotting* (WB) (Figura 7A).

No protocolo B, avaliou-se o efeito do tratamento *in vitro* com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M): 1) células-tronco satélites (mioblastos) durante a diferenciação pelo período de 24 h para análise dos conteúdos de *mRNA* de *MyoD*, *Miogenina* e *Myf6* pelo método de RT-PCR (Figura 7B1); 2) miotubos do quarto ao

sétimo dia pelo período de noventa e seis horas, após indução de diferenciação para análise dos conteúdos de *mRNA* de *desmina*, *vimentina* e *TRIM32* (Figura 7B2); e 3) fibroblastos durante 72 h para análise da expressão de *mRNA* de *PCNA*, *Ciclina D1*, *colágeno*, *fibronectina* e *pró-colágeno* (Figura 7B3).

Nos protocolos *in vivo* e *in vitro*, para extração das células-tronco satélites (mioblastos) e fibroblastos, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical.

PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

(A) Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante período de 28 dias de regeneração após a indução de lesão no músculo gastrocnêmio

(B1) Efeito do tratamento *in vitro* de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M) durante a diferenciação por período de 24 h para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD, miogenina e Myf6

(B2) Efeito do tratamento *in vitro* de miotubos já diferenciados com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) do quarto ao sétimo dia (período de noventa e seis horas) após indução de diferenciação para análise dos conteúdos de mRNA de desmina, vimentina e TRIM32

(B3) Efeito do tratamento *in vitro* de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de PCNA, Ciclina D1, colágeno, fibronectina e pró-colágeno

Figura 7: **Protocolos experimentais utilizados no presente estudo.** (A) Efeito da suplementação diária com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução de lesão por laceração no músculo gastrocnêmio; (B1) Efeito do tratamento *in vitro* de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 µM) durante a diferenciação pelo período de 24 h para análise dos conteúdos de mRNA de *MyoD*, *Myogenina* e *Myf6*; (B2) Efeito do tratamento *in vitro* de miotubos já diferenciados com os ácidos linoleico ou oleico (100µM) do quarto ao sétimo dia pelo período de noventa e seis horas, após indução de diferenciação para análise dos conteúdos de mRNA de *desmina*, *vimentina* e *TRIM32* e (B3) Efeito do tratamento *in vitro* de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 µM) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de *PCNA*, *Ciclina D1*, *colágeno*, *fibronectina* e *pró-colágeno*

6.2 Parâmetros nutricionais

Os ratos *Wistar* machos receberam ração balanceada para roedores (Nuvital, Curitiba, Brasil) contendo 22% de proteína, 4,5% de gordura, 40,8% de carboidrato e 8% de fibra, totalizando 3 Kcal/g de energia total (RODRIGUES et al., 2010). A composição de ácidos graxos da ração, na Tabela 2, é a mesma apresentada na tese de doutorado de Hosana Rodrigues em 2011 e no artigo publicado por ela (RODRIGUES et al., *Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats*, *Lipids*, 45(9), páginas 809-19, 2010).

Tabela 2: Composição de ácidos graxos da dieta comercial utilizada no estudo.

Ácidos Graxos	(%)
Ácido Capróico (6:0)	-
Ácido Caprílico (8:0)	0,37
Ácido Cáprico (10:0)	0,21
Ácido Láurico (12:0)	15,35
Ácido Mirístico (14:0)	0,05
Ácido Palmítico (16:0)	17,06
Ácido Margárico (17:0)	0,10
Ácido Esteárico (18:0)	2,23
Ácido Eicosapentaenóico (20:5 ω-3)	1,81
Ácido α-Linolénico (18:3 ω-3)	3,04
Ácido Docosaexaenóico (22:6 ω-3)	-
Ácido Araquidônico (20:4 ω-6)	-

Ácido Palmitoléico (16:1)	-
Ácido Linoléico (18:2 ω -6)	42,59
Ácido Oléico (18:1 ω -9)	17,15
Total	100
Ácidos Graxos Saturados	35,39
Ácidos Graxos Insaturados	64,60

De acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA (2008), o consumo médio diário de gordura monoinsaturada e poliinsaturada para homens adultos nos EUA é de 38 e 23 g, respectivamente, sendo constituídas principalmente por ácidos linoleico e oleico. Com base nessas informações, Hosana Rodrigues do nosso grupo calculou o equivalente em doses para serem utilizadas em seu estudo sobre o efeito dos ácidos linoleico e oleico na cicatrização de feridas em ratos. A suplementação com os ácidos linoleico e oleico (0,44 g/kg de peso corporal) foi realizada por via oral (gavagem), diariamente, durante 28 dias, conforme protocolo previamente utilizado pela Hosana (RODRIGUES et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos pela Hosana, a dose administrada (0,44 g/kg de peso corporal) de ácidos linoleico e oleico não altera a atividade das enzimas aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) no soro dos animais (RODRIGUES et al., 2010). A ingestão de ração não foi significativamente modificada pela suplementação com os ácidos graxos (Tabela 3).

Tabela 3: Ingestão de ração (g/dia) dos animais suplementados com ácidos linoleico ou oleico (0,44 g/kg de peso corporal). Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM de 7 animais por grupo.

	Óleo Mineral	Linoleico	Oleico
Ingestão de ração (g/dia)	20,25 $\pm$ 3,66	18,89 $\pm$ 2,62	18,42 $\pm$ 3,71

6.3 Indução da lesão muscular

Foi utilizado o modelo experimental de laceração descrito por Menetrey et al., (1999), em camundongos, adaptado para ratos por nosso grupo (PINHEIRO et al., 2012). Previamente ao procedimento cirúrgico (24 h), foi administrado o antibiótico gentamicina (80 mg/ kg de peso corpóreo).

Figura 8: **Indução da lesão no músculo gastrocnêmio.** A lesão consistiu em um corte no músculo na altura aproximada de 2,5 cm ou 60% do comprimento da inserção distal; corte transversal correspondendo a 75% ou 1 cm da largura do músculo; e 50% de profundidade ou espessura do músculo gastrocnêmio. A metodologia de indução da lesão por laceração foi realizada conforme descrito por Menetrey et al. (1999).

Os animais foram anestesiados com quetamina (35 mg/kg de peso corpóreo) e xilazina (5 mg/kg de peso corpóreo) via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia da região posterior da panturrilha e assepsia com solução aquosa de iodo polividona (PVPI) a 10%. Uma incisão de 2 cm foi realizada na pele e, após divulsionamento do tecido subcutâneo, a região ventral do músculo gastrocnêmio foi exposta. Com auxílio de uma lâmina cirúrgica estéril (nº 23), importado e distribuído por: LABOR IMPORT Com. Imp. Exp. Ltda. (Osasco, SP, Brasil) fabricada por: HUIAN ANGEL MEDICAL INSTRUMENTS Co., LTd. (Jiangsu, China (Mainland)), foi realizado corte transversal correspondendo a 75% ou 1 cm da largura do músculo, 50% de profundidade e na altura aproximada de 2,5 cm ou 60% do comprimento da inserção

distal, a partir do tendão calcâneo, referente ao ponto médio com relação ao comprimento longitudinal do músculo gastrocnêmio (Figura 8). Após a laceração, a pele foi suturada com fio de monofilamento de *nylon* 3-0 e a assepsia local realizada com solução de polivinil pirrolidona iodo (PVPI). A pata contralateral (esquerda) foi submetida aos mesmos procedimentos descritos acima com exceção da laceração no músculo gastrocnêmio. Todo material cirúrgico utilizado foi previamente esterilizado em autoclave.

6.4 Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas

Os lipídeos foram extraídos pelo método 996.06, cap. 41, p. 20-24, 2002 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) com modificações. Aproximadamente 300 mg de músculo gastrocnêmio, extraídos das patas contralateral e lesionada, foram utilizados. Foram adicionados: 1) o triglicerídeo do ácido tridecanóico (5 mg/mL clorofórmio) como padrão interno, com volumes variando de 100 a 400 µL, conforme a quantidade de tecido utilizada o ácido pirogálico (25 mg) para minimizar a oxidação dos ácidos graxos, 0,5 mL de etanol a 95% e algumas pérolas de vidro. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com 2,5 mL de HCl e agitadas em banho termostatizado à temperatura de 75 °C por 40 min. Após serem resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 6 mL de éter etílico e cada tubo foi mantido em agitador tipo Vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 6 mL de éter de petróleo e os tubos foram novamente agitados. Em seguida, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e a fase superior (etérea) foi transferida para outro tubo. O solvente foi evaporado lentamente em banho termostatizado em temperatura mais baixa que 40 °C, utilizando nitrogênio gasoso. Após essa etapa, foram adicionados 1 mL de trifluoreto de boro a 7% em metanol e 0,5 mL de tolueno e algumas pérolas de vidro. Os tubos foram bem tampados e colocados em banho fervente por 45 minutos. Após serem resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 2,5 mL de água, 1 mL de hexano e aproximadamente 0,5 g de Na₂SO₄ anidro. Após agitação, os tubos ficaram em repouso até a separação das fases. A fase superior foi transferida para um frasco de vidro. O solvente foi evaporado completamente. Foram então adicionados 100 µL de hexano, o precipitado ressuspenso e o volume total transferido para um tubo de 100 µL. Um microlitro das amostras foi analisado em cromatógrafo à gás GC 2010 Plus da

Shimadzu (São Paulo, SP, Brasil) Workstation GC solution, equipado com injetor automático AOC-20, detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (bis cianopropil polisiloxana) de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária da Supelco (Oakville, Ontário, Canadá). A programação de temperatura da coluna foi de 140 °C por 5 min, aquecimento a 4 °C /min até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o Hélio a um fluxo de 1 mL/min e a razão de divisão da amostra 1/50. Um microlitro do extrato lipídico derivatizado foi injetado. Os períodos de retenção dos ácidos graxos foram comparados com o padrão 189 19 Sigma. Os cálculos foram baseados na área e concentração do padrão interno, utilizando-se os fatores de resposta teóricos do detector de ionização de chama do método Ce 1j-07 da American Oil Chemists' Society (AOCS). Essas determinações foram realizadas pela Dra. Rosângela Pavan do laboratório de Lípidos do Professor Jorge Mancini Filho da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

6.5 Pesos dos músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor digital longo (EDL) e dos depósitos de gordura retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico

O peso úmido em gramas (g) dos músculos gastrocnêmio, sóleo e EDL, e dos depósitos de gordura retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico foi determinado logo após retirada. Para obtenção dos dados de peso seco, o músculo gastrocnêmio foi colocado em estufa durante 72 h, a 60 °C, para evaporação da água. Após esse período, o peso seco do músculo gastrocnêmio foi determinado e utilizado para normalização das forças musculares específicas.

6.6 Força muscular (absoluta e específica), propriedades contráteis e resistência à fadiga in situ

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (90 mg/kg peso corpóreo) e xilazina (10 mg/kg peso corpóreo). A pele dos membros posteriores foi removida. Os músculos que não eram alvo da avaliação foram tenotomizados (foram cortados os tendões distais dos músculos sinergistas (sóleo) e antagonistas (tibial anterior e EDL)). Uma incisão foi feita nas regiões proximal e

lateral da coxa e, em seguida, o nervo ciático foi localizado e o eletrodo de platina acoplado. A articulação do joelho foi estabilizada mecanicamente à 90 °C em plataforma de acrílico. O tendão calcâneo foi conectado à haste metálica acoplada ao transdutor de força (Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island, EUA). Contrações foram induzidas por eletroestimulação a 1 ou 100 Hz (Hertz). Foram então avaliadas as contrações isotônicas absolutas (mN) e específicas (mN/peso seco) (Figura 9A) assim como contrações tetânicas absolutas (mN) e específicas (mN/peso seco) (Figura 9B).

O estímulo para produção de contrações isotônicas consistiu de um pulso elétrico de 500 μ s de duração e frequência de 1 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima. Uma série de 5 ou 10 contrações foi realizada e usada para determinar a força isotônica absoluta máxima (Figura 9A), o tempo de contração (TTP – *time to peak* – tempo entre o início do desenvolvimento de força até a tensão máxima durante a contração) e o tempo de relaxamento (HRT – *half relaxation time* – tempo entre a tensão máxima e a redução de 50% da força durante o relaxamento). O estímulo para a produção de contrações tetânicas (isométricas) consistiu de um pulso de 500 μ s de duração e frequência de 100 Hz. A voltagem foi ajustada para induzir a produção de força máxima (Figura 9B). Foi realizada uma série de 10 contrações tetânicas. A primeira contração teve duração de dez segundos e foi utilizada para avaliação da força tetânica absoluta máxima e do tempo de sustentação da tetania (tempo para perda de 50% da força tetânica máxima) (Figura 9C). As nove contrações subsequentes tiveram duração de um segundo cada e foram realizadas em intervalos de 10 segundos entre elas. Estas contrações foram utilizadas para estimar a queda relativa de força em comparação à força tetânica máxima inicial (Figura 9C). A área sob a curva do gráfico gerado pela força *versus* o número de contrações foi determinada para calcular o decaimento da força (protocolo de resistência à fadiga *in situ*).

As forças isotônica e tetânica específicas foram obtidas por meio da normalização da força absoluta pelo peso seco do músculo gastrocnêmio em gramas. A voltagem mínima necessária para induzir uma contração muscular detectável no *triceps sural* definiu a reobase. A duração mínima de pulso para induzir contração detectável, usando o dobro da voltagem de reobase, foi também determinada (cronaxia).

Previamente, a amplitude máxima dos abalos musculares foi determinada por meio do comprimento muscular ideal dado por tração mecânica, usando *MultiStim System D330* (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido) e pela voltagem máxima capaz de gerar aumento na força de contração. Os dados de força máxima, as propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e a fadiga dos músculos gastrocnêmios foram captados pelo transdutor de força modelo FT03 (Grass Instruments Division, West Warwick, RI, EUA). A aquisição dos dados foi realizada utilizando o *software* AqDados (LYNX Tecnologia Eletrônica Ltda, (São Paulo, SP, Brasil). A força máxima desenvolvida foi determinada por meio do abalo muscular (100 Hz) de maior amplitude. A resistência à fadiga foi avaliada pela queda da produção de força ao longo dos sucessivos estímulos a 100 Hz. Os dados foram analisados utilizando os programas *softwares* *AqAnalysis* (LYNX Tecnologia Eletrônica Ltda) e *Microcal Origin™* (Microcal Software, Inc., Malvern, Worcestershire, UK).

Após o teste, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os músculos gastrocnêmios desidratados em estufa por 72 h para obtenção do peso seco (g).

A

B

C

Figura 9: **Força muscular (absoluta e específica), propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e resistência à fadiga *in situ* do músculo gastrocnêmio.** Contrações intensas foram promovidas por eletroestimulação. Forças isotônica e tetânica do músculo gastrocnêmio das patas estimuladas a 1 Hertz (A) e a 100 Hertz (B) foram avaliadas. As propriedades contráteis (velocidades de contração e relaxamento) e a resistência à fadiga (10 estímulos tetânicos) foram avaliadas pela queda da produção de força ao longo da estimulação a 100 Hertz (C) do músculo gastrocnêmico. O tempo de contração (TTP – *time to peak* – tempo entre o início do desenvolvimento de força até a tensão máxima durante a contração) e o tempo de relaxamento (HRT – *half relaxation time* – tempo entre a tensão máxima e a redução de 50% da força durante o relaxamento) (A). As nove contrações subsequentes tiveram duração de um segundo cada e foram realizadas em intervalos de 10 segundos entre elas. Estas contrações foram utilizadas para estimar a resistência à fadiga (queda relativa da força) em comparação à força tetânica máxima inicial (C).

6.7 Análise histológica

A preparação das lâminas foi realizada a partir de cortes seriados na porção central dos músculos gastrocnêmios lesionado e contralateral retirados dos animais. Após obtenção dos tecidos, os músculos foram fixados em *tissue tec* (*Optimal Cutting Temperature* – OCT, 4583, Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA) e mantidos em nitrogênio líquido. Os cortes foram então realizados transversalmente na porção ventral do músculo gastrocnêmio (10 µm), utilizando criostato (Leica CM 3050, Wetzlar, Germany). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise da área das fibras musculares. O aumento para obtenção das fotografias foi de 10 vezes, utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse E1000, Fukuoka, Japão) e uma câmera acoplada a este (Nixkon DXM 1200). Foram obtidas 5 fotografias por músculo e as imagens foram analisadas utilizando *Image Pro Plus Software* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Foram mensuradas as áreas de 25 fibras musculares adjacentes em cada fotografia, a partir do centro de cada seção, totalizando 125 fibras por músculo, sendo 500 fibras para quatro músculos no total. A barra de escala utilizada foi de 100 µm.

Para avaliação da área de tecido fibroso (colágeno), utilizou-se o método de *Picro Sirius Red* (SWEAT et al., 1964). Seguindo o mesmo preparo inicial para o método de HE, foram utilizadas as lâminas dos músculos gastrocnêmios das patas contralateral e lesionada, de quatro animais por grupo, que foram coradas com ácido pícrico saturado (100 mL em 1,3% de água) por 40 min. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 min, com passagens rápidas pelo álcool a 95% por 3

segundos, álcool 100% por 10 segundos (2x), xilol 1:1 por 5 min e xilol por 10 min (2x). As lâminas foram visualizados em microscópio de luz polarizada e as imagens (cinco imagens aleatórias) capturadas em câmera de vídeo (LG, modelo GC-415N-MD, ,Manomin, Minnesota, EUA) acoplada ao microscópio óptico (Leica modelo DMLP, Buffalo Grove, IL, EUA) com aumento de 100x. A análise das imagens (área de colágeno) foi realizada utilizando *software Image Pro Plus Software 6.0* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A magnitude das imagens (100 x) e o número de *pixels* foram expressos em relação ao número total detectado, conforme previamente sugerido por (MARSHALL et al., 1989).

6.8 Western Blotting

O músculo gastrocnêmio foi coletado 28 dias após da indução da lesão. O tecido foi homogeneizado em solução tampão para extração de proteínas (1% dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 100 mM de ortovanadato de sódio e 250 mM de cloreto de sódio). O homogenato foi incubado à 4 °C, por 10 min e, em seguida, centrifugado à 10.000 g, por 10 min, para remoção do material insolúvel. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) (Bio-rad, Hercules, CA, EUA), utilizando curva padrão de albumina. O restante do sobrenadante foi diluído em tampão Laemmli concentrado 5 vezes (1:5 v/v), contendo 100 mM de ditiotreitol e submetido à incubação por 10 min à 96 °C. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas a -80 °C para análise das proteínas. A separação eletroforética das proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida a 6% ou 12%, dependendo do peso molecular da proteína analisada, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad). A técnica de *Western blotting* foi realizada conforme metodologia descrita previamente por Burnette (1981), e que tem sido usada frequentemente por nosso grupo (HIRABARA et al., 2003).

As membranas foram bloqueadas com solução de albumina bovina de soro (BSA) ou leite desnatado a 5%, por 2 h, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra as proteínas de interesse, por uma noite, a 4 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas com

anticorpo secundário associado à peroxidase (Amershan Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA) por 90 min. A detecção das proteínas de interesse foi feita por meio do kit ECL de quimiluminescência (Amershan Pharmacia). Os anticorpos primários utilizados foram: *Anti Desmina* (53 kDa, Cell Sig # 4024), *Vimentina* (57 kDa, Sigma SAB45033083), *Pax7* (57 kDa, ab92317), *MuRF1* (38 kDa, ECM # MP3401), *Atrogina-1* (41 kDa, ECM # AP2041), *fosfo-44/42 MAPK* (44-42 kDa, Cell Sig # 9101), *44/42 MAPK* (44-42 kDa, Cell Sig # 4695), *fosfo-S6 Ribossomal* (32 kDa, Cell Sig # 5364), *S6 Ribossomal* (32 kDa, Cell Sig # 2217), *fosfo-NF-kappaB* (65 kDa, Cell Sig # 13346), *NF-kappaB* (65 kDa, Cell Sig # 4764) e *Alfa actina* (42kDa, Sigma A2597). As membranas foram expostas durante períodos de tempos variados a filmes de raios-X e posteriormente reveladas de forma convencional. Por fim, as bandas correspondendo às proteínas estudadas foram quantificadas por densitometria óptica, utilizando o software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A normalização foi realizada pela quantidade de proteínas totais presentes na membrana de nitrocelulose e quantificadas por Ponceau (GILDA; GOMES, 2013; ROMERO et al., 2010). Os valores densitométricos obtidos com anticorpo contra a proteína considerada constitutiva *gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase* (GAPDH) (37 kDa, Sigma SAB2701826) variaram com os tratamentos, por isso esta não foi utilizada para normalização dos resultados. Os valores individuais obtidos para cada proteína estão no Apêndice.

6.9 Cultura de células

A cultura primária de células musculares de rato foi preparada como previamente descrito por Lynge et al. (2001). Os músculos (sóleo, gastrocnêmio e quadríceps) das patas traseiras dos animais (ratos *Wistar* pesando entre 92 à 110 gramas) foram dissecados e cortados em pequenos pedaços para digestão com 2% de collagenase tipo II, 0,25% de tripsina e 0,1% de DNase. Após isolamento, os mioblastos foram colocados em placa de 6 poços (250.000 células por poço). As células foram mantidas em meio DMEM contendo 1% de penicilina e 20% de soro fetal bovino por dois a três dias. Após esse período, os mioblastos foram diferenciados em células musculares no mesmo meio contendo 1% de penicilina e 10% de soro de cavalo por 24 h.

Após período de proliferação e confluência de 50%, os mioblastos (n=6) foram diferenciados em células musculares em meio contendo 1% de penicilina e 10% de soro de cavalo por 24 h. As células-tronco satélites (mioblastos) em diferenciação foram tratadas com os ácidos graxos linoleico ou oleico (100 μ M) por período de 24 h após indução de diferenciação e coletadas para análise dos conteúdos de mRNA de *MyoD*, *Miogenina* e *Myf6*. Os genes citados foram normalizadas pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de 18S ribossomal (18S) e 60S proteína ribossomal *L37a* (RPL37a) **Protocolo Experimental B - Figura 7B1).**

Após período de proliferação das células e confluência de 50%, os mioblastos foram diferenciados em miotubos (n=9) por três dias. Foram utilizadas até duas passagens de mioblastos para o cultivo celular. Os miotubos foram tratados com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) do quarto ao sétimo dia (período de noventa e seis horas) para análise dos conteúdos de mRNA de *desmina*, *vimentina* e *TRIM32* por RT-PCR. Os genes citados foram normalizadas pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de 18S ribossomal (18S) e 60S proteína ribossomal *L37a* (RPL37a) **(Protocolo Experimental B - Figura 7B2).**

Após processo de extração e isolamento de mioblastos (células-satélites), fibroblastos (n=8) foram coletados e induzidos a proliferação em meio contendo 20% de soro fetal bovino até atingir confluência de 50%. . Foram utilizadas até duas passagens de fibroblastos para o cultivo celular. Após este período, os fibroblastos foram tratados com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de *PCNA*, *ciclina D1*, *colágeno*, *fibronectina* e *pró-colágeno* por RT-PCR. Os genes citados foram normalizadas pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein*, *zeta polypeptide* (YWHZ) e *TATA-binding protein* (Tbp) **(Protocolo Experimental B - Figura 7B3).**

6.10 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR

Para extração do RNA total, as células musculares foram homogeneizadas em *Trizol Reagent®* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante, para obtenção do RNA total. O RNA total foi extraído utilizando-se o *kit RNeasy* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para eliminar contaminação com DNA

genômico, as amostras de RNA total foram tratadas com *Turbo DNA-freeTM* (Ambion, Austin, TX, EUA). As amostras foram mantidas a -80 °C para posterior análise. A integridade do RNA total extraído das células musculares foi avaliada em gel de agarose a 1%. Em cada poço do gel, foram adicionados 1 µL de amostra acrescido de 0,5 µL de *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 3,5 µL de água ultrapura deionizada (Millipore, *Molsheim, France*) e autoclavada (Bioeng, Marília, SP) livre de aditivos químicos, nucleases, DNase e RNase. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TAE (80 V, 400 mA, por aproximadamente 45 minutos). Posteriormente, a integridade do RNA foi avaliada sob luz ultravioleta (UV), observando a presença e qualidade de duas bandas (28S e 18S) na proporção de 1,5:1, respectivamente. As imagens foram obtidas utilizando sistema de fotografia com transiluminador UV *BenchTop 3UVTM* (BioDoc-It TM Imaging System, CA, EUA). A concentração de RNA foi calculada por densidade óptica a 260 nm (cada unidade de leitura corresponde a 40 µg/mL de RNA), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). Um micrograma de RNA foi utilizado para transcrição reversa e síntese do cDNA, utilizando *primers* oligo-dT e *kit* de transcriptase reversa M-MLV (High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit 1000 Reactions, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada na seguinte ordem: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min. Para amplificação das seqüências de interesse, foram usados 2 µL de cDNA, 10 µL de SYBR Green (Platinum SYBR Green PCR Super Mix, Carlsbad, CA, USA) 0,4 µL (10 µM) do *primer sense* e 0,4 µL (10 µM) do *anti-sense* do gene-alvo (Tabela 4) e 7,2 µL de água ultrapura deionizada (Millipore) e autoclavada livre de aditivos químicos, nucleases, DNase e RNase. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) foi realizada nas seguintes etapas: (1) etapa inicial de ativação da enzima, a 95 °C por 10 min; (2) 40 ciclos que incluíram desnaturação, a 95°C por 15 min, anelamento dos *primers* a 60 °C (temperatura ótima para todos os pares de *primers* usados), por 30 segundos, e a extensão a 72 °C por 30 s; e (3) um ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 30 s, 60 °C por um minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95°C para obtenção das curvas de *melting*. A análise da fluorescência proporcionada pelo SYBR Green, conforme amplificação específica da seqüência de interesse, foi feita

no aparelho Rotor-Gene Q (Qiagen). O *cycle threshold* (CT), ciclo no qual a sequência de interesse havia sido amplificada o suficiente para gerar fluorescência distinguível da fluorescência de fundo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), foi avaliado em duplicata para cada amostra. A variação de CT (Δ CT) foi obtida por meio da subtração do CT do gene de interesse pelo CT do gene de referência ou *housekeeping*. As amostras avaliadas foram normalizadas pela média do Δ CT dos animais controle (Δ CT amostra – média Δ CT controle), obtendo-se o valor de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades relativas, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados

Gene	Primers	Temp. de anelamento
<i>MyoD</i>	Sense: CGCTCCAACTGCTCTGATG Anti-sense: TAGTAGGCGGCGTCGTAGCC	58,62°C 63,87°C
<i>Miogenina</i>	Sense: TCCCAGATGAAACCATGCCC Anti-sense: GTCTGACACCAACTCAGGGG	60,03°C 59,96°C
<i>Myf6</i>	Sense: TTTCGGATCATTCCAGGGGC Anti-sense: GGGAGTTTGCGTTCCTCTGA	60,11°C 59,97°C
<i>Desmina</i>	Sense: GACGCAGTGAACCAGGAGTT Anti-sense: ATCATCTCCTGCTTGGCTTG	60,00°C 60,00°C
<i>Vimentina</i>	Sense: TCCTTCGAAGCCATGTCCAC Anti-sense: GTGGTCACATAGCTCCGGTT	60,04°C 59,75°C
<i>TRIM 32</i>	Sense: GCGGTCAGCAGGAATTTGACA Anti-sense: ACTGTCAGGTTGTCGGTCAG	60,04°C 59,75°C
<i>PCNA</i>	Sense: A ACGTCTCCTTAGTGCAGCTTACTCT Anti-sense: TAATGATGTCTTCATTACCAGCACAT	63,29°C 58,94°C
<i>Ciclina-D1</i>	Sense: TAGGGCTGGTAGCATGAGGT Anti-sense: AGATCCCGGTGGTACGAGAA	60,03°C 60,03°C
<i>Pró-colágeno</i>	Sense: GCCAATCCTGTCAACCCTGA Anti-sense: GACTGCAGAAAACGCCGGTA	60,00°C 60,00°C
<i>Colágeno</i>	Sense: GAGAGTACTGGATCGACCCTAACC Anti-sense: CTGACCTGTCTCCATGTTGCA	57,90°C 57,21°C
<i>Fibronectina</i>	Sense: TGCACCGAAACCGGGAAGAG Anti-sense: AAAACAGCCAGGCTTGCTCTGA	60,00°C 60,00°C
<i>18S</i>	Sense: GGATCCATTGGAGGGCAAGT Anti-sense: ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	60,00°C 60,00°C
<i>RPL37a</i>	Sense: CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG Anti-sense: GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC	60,00°C 60,00°C

<i>YWHZ</i>	Sense: AGAAGACGGAAGGTGCTGAG Anti-sense: GGTATGCTTGCTGTGACTGG	60,00°C 60,00°C
<i>Tbp</i>	Sense: GCACAGGAGCCAAGAGTGAA Anti-sense: TTCACATCACAGCTCCCCAC	60,00°C 60,00°C

Proteína de determinação mioblástica (*MyoD*); Fator miogênico 6 (*Myf6*); *Tripartite motif-containing protein (TRIM32)*; *Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)*; 18S ribossomal (18S); 60S proteína ribossomal L37a (RPL37a); *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHZ)* e *TATA-binding protein (Tbp)*.

6.11 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados pelo programa GraphPad (v 4.0, GraphPad Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Para comparação estatística entre os grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* (para comparação entre três grupos). A análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi usada para a comparação entre três ou mais grupos. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para valor de *p* igual ou menor que 0,05. Os dados foram analisados e considerados *outliers* conforme *Grubbs' test - GraphPad Software* (graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm). Os valores individuais estão apresentados no Apêndice.

7 RESULTADOS

7.1 Efeito da suplementação diária com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução de lesão sobre a composição de ácidos graxos do músculo gastrocnêmio

- **Protocolo experimental A (Figura 7A)**

7.1.1 A suplementação com os ácidos linoleico e oleico foi acompanhada por alterações na composição de ácidos graxos (% do total) no músculo gastrocnêmio durante a regeneração

A lesão elevou (1,9 vezes) o conteúdo de ácido palmitoléico (n-7) em relação ao músculo contralateral dos animais que receberam óleo mineral. A suplementação com ácido oleico aumentou (1,9 vezes) o conteúdo de ácido palmitoléico (n-7) no músculo lesionado em relação a pata contralateral do mesmo grupo (Figura 10A). Com a lesão, houve diminuição de 38% no conteúdo de ácido esteárico quando comparado ao músculo contralateral nos animais que receberam óleo mineral. Ocorreu aumento de 58% e 64% no conteúdo de ácido esteárico no músculo gastrocnêmio lesionado dos animais suplementados com ácidos linoleico e oleico, respectivamente, em relação ao músculo lesionado do grupo que recebeu óleo mineral (Figura 10A). Na lesão, houve aumento (57%) no conteúdo do ácido oleico (n-9) quando comparado ao músculo contralateral nos animais que receberam óleo mineral (Figura 10A). A suplementação com ácido linoleico diminuiu (30%) o conteúdo de ácido linoleico (n-6) no músculo contralateral quando comparado a pata contralateral dos animais que receberam óleo mineral (Figura 10A). A suplementação com ácido linoleico aumentou (em 4,1 vezes) o conteúdo de ácido eicosatrienóico (n-6), quando comparada aos animais que receberam óleo mineral, no músculo contralateral (Figura 10A). A suplementação com ácido linoleico elevou em 40% o conteúdo de ácido araquidônico (n-6) na pata contralateral em relação ao grupo que recebeu óleo mineral (Figura 10A). Quando comparada ao óleo mineral, a suplementação com ácido oleico aumentou em 2,4 vezes o conteúdo de ácido docosa-hexaenóico (n-3) na pata lesionada (Figura 10A). Não foram detectadas alterações nos conteúdos dos ácidos mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico, vacênico, alfa-linolênico, eicosadienóico, docosapentaenóico, docosapentaenóico com a lesão ou tratamentos com os ácidos graxos (Figura 10A). Os valores

individuais da composição de ácidos graxos (% do total) no músculo gastrocnêmio durante a regeneração estão contidos na Tabela 5.

Figura 10: *Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a indução de lesão sobre a composição de ácidos graxos (% do total) no músculo gastrocnêmio (A).* Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de quatro animais por grupo e comparados utilizando two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O dados da média $\pm$ EPM e significâncias * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Dados referentes a *Figura 10A*, apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de quatro animais por grupo e comparados utilizando *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada.

Formula	Nome	Om		Lin		Ole	
		C	L	C	L	C	L
14:0	Mirístico	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15:0	Pentadecanóico	ND	0,509 $\pm$ 0,081	ND	ND	ND	ND
16 : 0	Palmitico	17,793 $\pm$ 1,631	18,917 $\pm$ 0,378	18,498 $\pm$ 1,489	18,075 $\pm$ 0,475	19,098 $\pm$ 0,289	20,098 $\pm$ 0,358
16 : 1 (n-7)	Palmitoleico	1,010 $\pm$ 0,342	2,019 $\pm$ 0,409	ND	1,103 $\pm$ 0,109	0,545 $\pm$ 0,133	1,038 $\pm$ 0,328
17 : 0	Margárico	0,483 $\pm$ 0,072	ND	0,805 $\pm$ 0,282	ND	0,543 $\pm$ 0,043	ND
18 : 0	Esteárico	11,335 $\pm$ 1,162	7,095 $\pm$ 0,737	14,428 $\pm$ 0,212	11,268 $\pm$ 1,166	14,030 $\pm$ 1,040	11,650 $\pm$ 1,634
18 : 1 (n-9)	Oleico	11,285 $\pm$ 1,608	17,819 $\pm$ 1,110	8,413 $\pm$ 1,048	13,775 $\pm$ 2,189	11,835 $\pm$ 2,242	14,580 $\pm$ 2,057
18 : 1 (n-7)	Vacênico	2,255 $\pm$ 0,203	2,266 $\pm$ 0,062	2,615 $\pm$ 0,100	2,473 $\pm$ 0,074	2,660 $\pm$ 0,070	2,543 $\pm$ 0,064
18 : 2 (n-6)	Linoleico	33,415 $\pm$ 4,873	35,339 $\pm$ 1,050	23,673 $\pm$ 1,417	29,263 $\pm$ 1,585	26,083 $\pm$ 0,918	30,135 $\pm$ 3,122
18 : 3 (n-3)	α -Linolênico	2,740 $\pm$ 1,103	1,617 $\pm$ 0,126	ND	2,070 $\pm$ 0,501	ND	ND
20 : 2 (n-7)	Eicosadienóico	0,885 $\pm$ 0,617	0,609 $\pm$ 0,110	3,293 $\pm$ 1,766	1,518 $\pm$ 0,423	1,040 $\pm$ 0,342	ND
20 : 3 (n-6)	Eicosatrienóico	0,600 $\pm$ 0,258	0,490 $\pm$ 0,118	2,483 $\pm$ 1,090	1,350 $\pm$ 0,361	ND	ND
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	11,598 $\pm$ 1,190	8,576 $\pm$ 1,146	16,318 $\pm$ 0,476	11,920 $\pm$ 1,195	14,715 $\pm$ 0,973	12,728 $\pm$ 2,100
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,910 $\pm$ 0,342	1,026 $\pm$ 0,237	1,553 $\pm$ 0,409	1,075 $\pm$ 0,270	1,323 $\pm$ 0,160	1,138 $\pm$ 0,271
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	1,205 $\pm$ 0,143	1,059 $\pm$ 0,215	1,750 $\pm$ 0,397	1,390 $\pm$ 0,320	1,808 $\pm$ 0,311	1,468 $\pm$ 0,290
22 : 6 (n-3)	Docosa-hexaenóico	4,485 $\pm$ 0,815	1,891 $\pm$ 0,227	5,390 $\pm$ 0,522	3,898 $\pm$ 0,581	6,320 $\pm$ 0,876	4,628 $\pm$ 1,201

ND - Não detectado.

Diferença detectada na lesão em animais que receberam óleo mineral

Diferença detectada na suplementação com ácido linoleico versus óleo mineral (músculo contralateral)

Diferença detectada na suplementação com ácido oleico versus óleo mineral (músculo lesionado)

Diferença detectada na suplementação com ácido oleico versus óleo mineral (músculo lesionado)

7.1.2 Alterações na composição total de ácidos graxos monoinsaturados e no índice de dessaturação (razão oleico/ esteárico) no músculo gastrocnêmio durante a regeneração

A lesão elevou (51%) o conteúdo dos ácidos monoinsaturados em relação ao músculo contralateral dos animais que receberam óleo mineral (Figura 11A). Não houve mudança da razão n-6/ n-3 (Figura 11B). A laceração provocou aumento (2,4 vezes) da razão oleico/ esteárico, indicador da atividade de dessaturase no grupo que recebeu óleo mineral (Figura 11C). A suplementação com ácido linoleico ou oleico reduziu a razão oleico/esteárico, respectivamente, em 51% e 48% nos músculos lesionados em relação ao grupo que recebeu óleo mineral (Figura 11C). Houve também aumento (2 vezes) da razão palmitoleico/ palmítico durante a regeneração, no grupo óleo mineral (dados não mostrados, calculados a partir da Figura 11A).

Figura 11: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a indução de lesão sobre a composição total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados n-3 e n-6 (A), razão entre ácidos graxos n-6/ n-3 (B) e razão oleico/ esteárico (C), no músculo gastrocnêmio** Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de quatro animais por grupo e comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A1, A2 e A3 do Apêndice.

7.1.3 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a massa do músculo gastrocnêmio nas patas lesionada e contralateral

A suplementação com ácido linoleico reduziu (7%) o peso úmido do músculo gastrocnêmio da pata contralateral em relação ao óleo mineral. Também ocorreu diminuição de 15% no peso úmido do músculo gastrocnêmio da pata lesionada dos animais que receberam suplementação com o ácido linoleico em relação ao grupo suplementado com óleo mineral (Figura 12A). O peso do músculo gastrocnêmio lesionado dos animais suplementados com ácido linoleico apresentou diminuição de 14% em relação ao contralateral. Houve redução do peso úmido do músculo sóleo em 18% na pata lesionada dos animais que receberam suplementação com ácido linoleico em relação ao grupo com óleo mineral (Figura 12B). Por outro lado, foi observado aumento de 16% no peso úmido do músculo EDL na pata lesionada, em relação à contralateral, nos animais que receberam óleo mineral. Essa elevação, contudo, foi abolida pela suplementação com ambos ácidos graxos (Figura 12C). O peso úmido do músculo EDL da pata contralateral foi mais elevado (21%) nos animais suplementados com ácido oleico em relação aos que receberam óleo mineral (Figura 12C).

Figura 12: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão sobre o peso úmido (g) dos músculos gastrocnêmio (A), sóleo (B) e EDL (C).** Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais por grupo e comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A4, A5 e A6 do Apêndice.

7.1.4 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a massa dos depósitos de gordura: retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico

A suplementação com ácido linoleico reduziu (31%) a massa da gordura epididimal quando comparada aos animais que receberam óleo mineral (Figura 13C). Nos demais depósitos e tratamentos não houve alteração significativa.

Figura 13: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão sobre a massa de gordura retroperitoneal (A), subcutânea (B), epididimal (C) e mesentérica (D).** Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais por grupo e comparados utilizando o teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$; Om = óleo mineral; Lin = linoleico; Ole = oleico. Os valores individuais estão nos quadros A7, A8, A9 e A10 do Apêndice.

7.1.5 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após a indução da lesão sobre as forças isotônica e tetânica, específicas e absolutas, do músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais

Houve diminuição (28%) da força isotônica específica no músculo lesionado dos animais que receberam óleo mineral quando comparado ao músculo contralateral. Houve decréscimo (40%) da força isotônica específica no músculo lesionado dos animais suplementados com ácido linoleico quando comparado a pata contralateral (Figura 14B). O tratamento com ácido linoleico diminuiu a força isotônica específica (24%) no músculo contralateral e no músculo lesionado (36%) quando comparado, respectivamente, aos músculos contralateral e lesionado dos animais que receberam óleo mineral (Figura 14B). A suplementação com ácido oleico preveniu o decréscimo da força isotônica específica em ambos músculos contralateral e lesionado (Figura 14B). A suplementação com ácido linoleico diminuiu (33%) a força isotônica específica no músculo lesionado quando comparado a pata lesionada dos animais suplementados com ácido oleico (Figura 14B). Ocorreu decréscimo de 22% da força tetânica absoluta na pata lesionada, em relação à contralateral, nos animais suplementados com óleo mineral (Figura 14C). A suplementação com os ácidos linoleico (24%) e oleico (28%) elevou a força tetânica absoluta nos músculos lesionados, quando comparados à pata lesionada dos animais que receberam óleo mineral (Figura 14C). Houve diminuição (23%) da força tetânica específica no músculo lesionado dos animais que receberam óleo mineral, em relação ao músculo contralateral. O tratamento com ácido linoleico diminui a força tetânica específica (25%) no músculo contralateral, em relação ao grupo óleo mineral (Figura 14D).

Figura 14: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após lesão no músculo gastrocnêmio sobre as forças isotônica absoluta (1 Hz) (A) e isotônica específica (1 Hz) (mN/g) (B); e forças absoluta tetânica (100 Hz) (C) e tetânica específica (100 Hz) (mN/g) (D).** Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Foram utilizados oito animais no grupo óleo mineral e nove nos grupos suplementados com ácidos graxos para avaliação das forças absolutas. Utilizou-se quatro animais no grupo óleo mineral e cinco nos grupos suplementados com ácidos graxos para avaliação das forças específicas. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A11, A12, A13 e A14 do Apêndice.

7.1.6 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre as propriedades contráteis do músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais

O TTP é o período de tempo entre o início do desenvolvimento de força até a tensão máxima durante a contração. Não ocorreu alteração no tempo de contração (*time to peak* - TTP) do músculo gastrocnêmio dos grupos estudados (Figura 15A). O músculo gastrocnêmio também não apresentou alteração no *half relaxation time* – (HRT) nos grupos avaliados (Figura 15B). O HRT é determinado como sendo o período de tempo entre a tensão máxima e a redução de 50% da força durante o relaxamento.

Figura 15: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) durante 28 dias após a lesão no músculo gastrocnêmio sobre as propriedades contráteis, associadas ao tempo de contração TTP (ms)(A) e tempo de relaxamento HRT (ms) (B).** Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Utilizou-se oito animais no grupo óleo mineral e nove nos grupos suplementados com os ácidos graxos para avaliação do *time to peak* (TTP) (ms) e *half relaxation time* (HRT) (ms). Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A16 e A17 do Apêndice.

7.1.7 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico durante 28 dias após indução da lesão sobre a resistência à fadiga do músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas e contralaterais

No protocolo de resistência à fadiga (Figura 16A), o músculo gastrocnêmio lesionado dos animais que receberam óleo mineral apresentou diminuição de 34%, 37% e 41%, respectivamente, na oitava, nona e décima contrações, em relação ao músculo contralateral (Figura 16B). A resistência à fadiga do músculo contralateral nos animais suplementados com ácido linoleico foi menor em 27%, 28% e 32%, respectivamente, na oitava, nona e décima contrações, quando comparados à pata contralateral dos animais que receberam óleo mineral (Figura 16B). A suplementação com ácido linoleico também diminuiu a resistência à fadiga em 38%, 36% e 32% no músculo lesionado, na oitava, nona e décima contrações, em relação ao músculo contralateral do grupo óleo mineral (Figura 16B).

Figura 16: *Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre as curvas de resistência à fadiga (decaimento da força) (A), a resistência à fadiga na oitava, nona e décima contrações (B), 28 dias após a lesão no músculo gastrocnêmio.* Contrações musculares intensas foram evocadas pela estimulação elétrica direta do

nervo ciático (100 Hz). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Foram utilizados quatro animais no grupo óleo mineral e cinco para os suplementados no ensaio de resistência à fadiga (% em relação à força inicial) (A e B). Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A18 do Apêndice.

7.1.8 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas contralaterais 28 dias após indução da lesão

A análise morfológica foi realizada no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais de quatro animais por grupo. Os cortes histológicos foram realizados transversalmente no músculo gastrocnêmio (10 μ m) e corados com HE. A suplementação com o ácido linoleico durante 28 dias após a lesão comprometeu a regeneração muscular em relação ao grupo óleo mineral, apresentando diminuição de 25% na área de secção transversa do músculo gastrocnêmio lesionado (Figura 17A). O músculo lesionado apresentou redução de 10% na área de secção transversa quando comparado com o contralateral nos animais suplementados com ácido linoleico (Figura 18D). No músculo contralateral dos animais suplementados com ácido linoleico, ocorreu decréscimo (20%) da área de secção transversa (Figura 18C) quando comparado à pata contralateral dos animais que receberam óleo mineral. Os efeitos da suplementação com ácido linoleico foram mais acentuados com a lesão, onde é possível visualizar espessamento da área de tecido conjuntivo no músculo regenerado (Figura 18D). Na Figura 17B observa-se maior dispersão na área de secção transversa do músculo gastrocnêmio na pata lesionada do grupo óleo mineral. O tratamento com os ácidos graxos aboliu esta variabilidade dos resultados no músculo lesionado.

Figura 17: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a média da área de secção transversa (A) e a dispersão dos dados individuais (B) do músculo gastrocnêmio analisadas por meio da coloração de HE 28 dias após lesão.** A análise da área de secção transversa foi realizada no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, no grupo que recebeu óleo mineral e nos suplementados com os ácidos linoleico ou oleico. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de quatro animais, Cento e vinte e cinco fibras musculares foram analisadas por pata, totalizando quinhentas fibras por músculo e grupo. Para comparação foi utilizado o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores da média $\pm$ EPM estão no quadro A19 do Apêndice.

Aumento (10x)

Figura 18: ***Imagens representativas do efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a morfologia do músculo gastrocnêmio analisada por meio da coloração de hematoxilina e eosina (HE) 28 dias após lesão. Objetiva de 10X.*** Imagens representativas do corte histológico do músculo gastrocnêmio das patas contralaterais e lesionadas dos animais que receberam óleo mineral (A e B), ácido linoleico (C e D) ou ácido oleico (E e F). Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada.

7.1.9 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre a área de tecido fibroso no músculo gastrocnêmio nas patas lesionadas e contralaterais 28 dias após indução da lesão

A análise morfológica da área de tecido fibroso foi realizada no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais de quatro animais por grupo. Os cortes histológicos foram realizados transversalmente no músculo gastrocnêmio (10 µm) e corados com *Picro Sirius Red*. Houve aumento (1,6 vezes) da área de tecido fibroso no músculo lesionado dos animais que receberam óleo mineral em relação a contralateral (Figura 19A). Nos animais suplementados com ácido linoleico, houve aumento da área de tecido fibroso (2,1 vezes) no músculo gastrocnêmio da pata lesionada quando comparado à pata contralateral (Figura 19A). A suplementação com o ácido linoleico após a lesão comprometeu a regeneração muscular em relação ao grupo óleo mineral, elevando (em 1,5 vezes) a área de tecido fibroso do músculo gastrocnêmio lesionado (Figura 20D). O músculo lesionado dos animais suplementados com ácido linoleico apresentou aumento de 2 vezes na área de tecido fibroso quando comparado com o músculo lesionado dos animais suplementados com ácido oleico (Figura 20D). Os efeitos da suplementação com ácido linoleico foram acentuados com a lesão, onde observa-se densa área de tecido fibroso no músculo regenerado (Figura 20D). Na imagem representativa (Figura 20E), verifica-se que a suplementação com ácido oleico aboliu o aumento da fibrose no músculo regenerado.

Figura 19: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a área de tecido fibroso do músculo gastrocnêmio analisadas por meio da coloração por Picro Sirius Red 28 dias após lesão (A).** A análise da área de secção transversa foi realizada no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, no grupo que recebeu óleo mineral e nos suplementados com os ácidos linoleico ou oleico. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de quatro animais, Cento e vinte e cinco fibras musculares foram analisadas por pata, totalizando quinhentas fibras por músculo e grupo. Para comparação foi utilizado o teste *two-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores da média $\pm$ EPM estão no quadro A20 do Apêndice.

Aumento (10x)

Figura 20: **Imagens representativas do efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre a morfologia do músculo gastrocnêmio analisada por meio da coloração de Picro Sirius Red, 28 dias após lesão. Objetiva de 10x.** Imagens representativas do corte histológico do músculo gastrocnêmio das patas contralaterais e lesionadas dos animais que receberam óleo mineral (A e B), ácido linoleico (C e D) ou ácido oleico (E e F). Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada.

7.1.10 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de desmina e vimentina no músculo gastrocnêmio das patas contralaterais lesionadas 28 dias após indução da lesão

A análise por *two way* ANOVA destaca a existência de variação com a suplementação de ácido oleico sobre o conteúdo de desmina ($p<0,05$), mas que não é detectável pelo pós teste de *Bonferroni* (Figura 21B). Houve aumento de 4,9 e 2,8 vezes, respectivamente, no conteúdo de vimentina dos músculos gastrocnêmios contralateral e lesionado dos animais suplementados com ácido oleico em relação aos que receberam óleo mineral (Figura 21C).

Figura 21: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de desmina (B), vimentina (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais no grupo óleo mineral e seis nos suplementados com os ácidos linoleico e oleico. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de *Bonferroni*; * $p<0,05$ e ** $p<0,01$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico

pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A21 e A22 do Apêndice.

7.1.11 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de *p*-NF-kappaB e *p*-NF-kappaB/NF-kappaB nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão

Não houve alteração no conteúdo de *p*-NF-kappaB e na razão *p*-NF-kappaB/NF-kappaB nos músculos gastrocnêmios dos animais que receberam óleo mineral e suplementados com os ácidos linoleico e oleico (Figura 22B).

Figura 22: ***Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de p-NF-kappaB (B), NF-kappaB (C), e razão p-NF-kappaB/NF-kappaB (D) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.*** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais no grupo óleo mineral e sete suplementados com os ácidos linoleico e oleico. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A23, A24 e A25 do Apêndice.

7.1.12 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de p-44-42 MAPK e p-44-42 MAPK/ 44-42 MAPK nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão

Não ocorreu alteração no conteúdo de p-44-42 MAPK e na razão p-44-42 MAPK/ 44-42 MAPK nos músculos gastrocnêmios dos animais que receberam óleo mineral e suplementados com os ácidos linoleico e oleico (Figura 23B).

Figura 23: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de *p*-44-42 MAPK (B), 44-42 MAPK (C), e na razão *p*-44-42 MAPK/ 44-42 MAPK (D) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais no grupo óleo mineral e sete suplementados com os ácidos linoleico e oleico. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata

lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A26, A27 e A28 do Apêndice.

7.1.13 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de *p*-S6 e na razão *p*-S6/ S6 total nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão

Houve aumento de 81% no conteúdo de *p*-S6 do músculo gastrocnêmio contralateral dos animais suplementados com ácido linoleico em relação à pata contralateral dos animais que receberam óleo mineral (Figura 24B). Não ocorreu alteração na razão *p*-S6/ S6 total (Figura 24D).

Figura 24: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de p-S6 (B), e S6 total (C), e na razão p-S6 / S6 no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais no grupo óleo mineral e sete suplementados com os ácidos linoleico e oleico. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni; $**p < 0,01$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A29, A30 e A31 do Apêndice.

7.1.14 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de MuRF1 e Atrogin-1 nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão

Não ocorreu alteração no conteúdo de *MuRF1* (Figura 25B) e *Atrogin-1* (Figura 25C).

Figura 25: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de *MuRF1* (B), e *Atrogin-1* (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de sete animais no grupo óleo mineral e sete suplementados com os ácidos linoleico e oleico. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A32 e A33 do Apêndice.

7.1.15 Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico sobre o conteúdo de Pax7 e Alfa actina nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais e lesionadas 28 dias após indução da lesão

Houve aumento de 3,2 vezes no conteúdo de *Pax7* do músculo gastrocnêmio contralateral dos animais suplementados com ácido linoleico em relação aos animais que receberam óleo mineral (Figura 26B). Houve diminuição (58%) do conteúdo de *Alfa actina* do músculo gastrocnêmio lesionado quando comparado ao contralateral nos animais suplementados com ácido linoleico (Figura 26C).

Figura 26: **Efeito da suplementação com os ácidos linoleico e oleico (doses diárias de 0,44 g/kg de peso corporal) sobre os conteúdos de Pax7 (B), e Alfa actina (C) no músculo gastrocnêmio das patas lesionadas e contralaterais, 28 dias após a lesão.** Em (A) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Foram utilizados quatro animais no grupo óleo mineral e seis animais nos grupos suplementados com os ácidos linoleico e oleico para avaliação do conteúdo de *Pax7*. Utilizou-se sete animais nos grupos óleo mineral e seis à sete nos grupos suplementados com os ácidos linoleico e oleico para avaliação do conteúdo de *Alfa actina*. As proteínas avaliadas foram normalizadas pelo conteúdo proteico total indicado por Ponceau. Os resultados foram comparados

utilizando o teste *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni; * $p < 0,05$. Om C = óleo mineral pata contralateral; Om L = óleo mineral pata lesionada; Lin C = linoleico pata contralateral; Lin L = linoleico pata lesionada; Ole C = oleico pata contralateral; Ole L = oleico pata lesionada. Os valores individuais estão nos quadros A34 e A35 do Apêndice.

Resumo dos achados referentes: 1) a comparação entre os músculos gastrocnêmios das patas lesionadas e contralaterais de cada grupo (indicada com setas vazias $\uparrow$ ou $\downarrow$); 2) aos efeitos da suplementação com os ácidos linoleico ou oleico no músculo gastrocnêmio em relação ao tratamento com óleo mineral (indicados com setas cheias $\uparrow$ ou $\downarrow$).

	Óleo Mineral		Linoleico		Oleico	
	C	L	C	L	C	L
Conteúdo de Ácido Palmitoleico		$\uparrow$				$\downarrow$
Conteúdo de Ácido Esteárico		$\downarrow$		$\uparrow$		$\uparrow$
Conteúdo de Ácido Oleico		$\uparrow$				
Conteúdo de Ácido Linoleico			$\downarrow$			
Conteúdo de Ácido Eicosatrienóico			$\uparrow$			
Conteúdo de Ácido Araquidônico			$\uparrow$			
Conteúdo de Ácido Docosapentaenóico						$\uparrow$
Massa do Músculo Gastrocnêmio			$\downarrow$	$\downarrow$		
Massa do Músculo Sóleo				$\downarrow$		
Massa do Músculo EDL		$\uparrow$			$\uparrow$	
Massa de gordura Retroperitoneal						
Massa de gordura Subcutânea						
Massa de gordura Epididimal			$\downarrow$			
Massa de gordura Mesentérica						
Força Isotônica Absoluta						
Força Isotônica Específica		$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$		$\uparrow$
Força Tetânica Absoluta		$\downarrow$		$\uparrow$		$\uparrow$
Força Tetânica Específica		$\downarrow$	$\downarrow$			
TTP						
HRT						
Resistência à Fadiga (queda da força)		$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$		
Área de Secção Transversa da Fibra			$\downarrow$	$\downarrow$		
Área de Tecido Fibroso		$\uparrow$		$\uparrow$		$\downarrow$
Conteúdo de Desmina						
Conteúdo de Vimentina					$\uparrow$	$\uparrow$
Conteúdo de <i>p</i> -NF- κ B						
Conteúdo de NF- κ B total						
Conteúdo de <i>p</i> -NF- κ B/NF- κ B						
Conteúdo de <i>p</i> -44-42 MAPK						
Conteúdo de 44-42 MAPK total						
Conteúdo de <i>p</i> -44-42/44-42 MAPK						
Conteúdo de <i>p</i> -S6			$\uparrow$			
Conteúdo de S6 total						
Conteúdo de <i>p</i> -S6/S6 total						
Conteúdo de MuRF1						
Conteúdo de Atrogina-1						
Conteúdo de Pax7			$\uparrow$			
Conteúdo de Alfa actina				$\downarrow$		

Pata esquerda = contralateral (C) e Pata direita = lesionada (L)
 $\downarrow$ = diminuição e $\uparrow$ = aumento TTP: time to peak; HRT: half relaxation time

7.2 Efeito do tratamento *in vitro* de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M), durante a diferenciação no período de 24 horas para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD, Miogenina e Myf6

- Protocolo experimental B (Figura 7B1)**

7.2.1 Efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M) em mioblastos, 24 h após indução de diferenciação

Houve aumento de 96% no conteúdo de mRNA de MyoD em mioblastos tratados com ácido oleico (100 μ M), 24 h após indução de diferenciação (Figura 27A).

Figura 27: Efeito do tratamento *in vitro* de células-tronco satélites (mioblastos) com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M) durante a diferenciação por período de 24 horas para análise dos conteúdos de mRNA de MyoD (A), Miogenina (B) e Myf6 (C). Os genes avaliados foram

normalizados pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de 18S e PRL37a. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) (n=6) e comparados utilizando o teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*; $*p<0,05$. Os valores individuais estão nos quadros A36, A37 e A38 do Apêndice.

7.3 Efeito do tratamento *in vitro* de miotubos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) do quarto ao sétimo dia (pelo período de noventa e seis horas) após indução de diferenciação para análise dos conteúdos de mRNA de desmina, vimentina e TRIM 32

- Protocolo experimental B (Figura 7B2)**

7.3.1 Efeito do tratamento com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M) em miotubos já diferenciados por período de 96 h

Houve aumento de 2,8 e 1,9 vezes nos conteúdos de mRNA de *Desmina* em miotubos tratados com ácido oleico (100 μ M), por período de noventa e seis horas, respectivamente, quando comparados aos miotubos controles ou tratados com ácido linoleico (Figura 28A).

Figura 28: **Efeito do tratamento *in vitro* de miotubos (do quarto ao sétimo dia após indução de diferenciação) com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) pelo período de noventa e seis horas para análise dos conteúdos de mRNA de desmina (A), vimentina (B) e TRIM32 (C).** Os genes avaliados foram normalizados pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de 18S e PRL37a. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) (n=9) e comparados utilizando o teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os valores individuais estão nos quadros A39, A40 e A41 do Apêndice.

7.4 Efeito do tratamento *in vitro* de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de PCNA, ciclina D1, colágeno, fibronectina e pro-colágeno

- **Protocolo experimental B (Figura 7B3)**

7.4.1 Efeito do tratamento de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) por 72 h sobre a proliferação celular (PCNA e ciclina D1)

Houve diminuição de 68% e 78% no conteúdo de mRNA de PCNA em fibroblastos, respectivamente, tratados com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M), por período de noventa e seis horas, em relação ao controle (Figura 29A).

Figura 29: **Efeito do tratamento *in vitro* de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de PCNA (A) e Ciclina D1 (B).** Os genes avaliados foram normalizados pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de YWHz e Tbp. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) (n=8) e comparados utilizando o teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*; ** $p < 0,01$. Os valores individuais estão nos quadros A42 e A43 do Apêndice.

7.4.2 O tratamento de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) por 72 h sobre a expressão de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina e pró-colágeno)

Houve diminuição de 78% e 75% na expressão de mRNA de Colágeno em fibroblastos, respectivamente, tratados com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M), por período de noventa e seis horas, em relação ao controle (Figura 30A). Ocorreu decréscimo de 80% na expressão de mRNA de Fibronectina nos fibroblastos, tratados com ambos os ácidos linoleico e oleico (100 μ M), por período de noventa e seis horas, em relação ao controle (Figura 30B). Não houve alteração na expressão de (mRNA) pró-colágeno (Figura 30C).

Figura 30: **Efeito do tratamento *in vitro* de fibroblastos com os ácidos linoleico ou oleico (100 μ M) durante 72 h para análise da expressão de mRNA de colágeno I (A), fibronectina (B) e pro-colágeno (C).** Os genes avaliados foram normalizados pelo conteúdo (média geométrica) de mRNA de YWHZ e Tbp. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) (n=8) e comparados utilizando o teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os valores individuais estão nos quadros A44, A45 e A46 do Apêndice.

Resumo dos efeitos do tratamento *in vitro* de mioblastos (período de 24 h), miotubos já diferenciados (período de 96 h) e fibroblastos (período de 72 h) com os ácidos linoleico e oleico (100 μ M)

Mioblastos	Linoleico	Oleico
<i>MyoD</i>		↑
<i>Myogenin</i>		
<i>Myf6</i>		

Miotubos		
<i>Desmina</i>		↑ ↑
<i>Vimentina</i>		
<i>TRIM32</i>		

Fibroblastos		
<i>PCNA</i>	↓	↓
<i>Ciclina D1</i>		
<i>Colágeno I</i>	↓	↓
<i>Fibronectina</i>	↓	↓
<i>Pro-colágeno</i>		

↑ = aumento em relação ao controle (sem tratamento)

↓ = diminui em relação ao controle (sem tratamento)

↑ = aumento em relação ao linoleico

7 DISCUSSÃO

O protocolo de lesão por laceração desenvolvido em ratos no presente estudo foi baseado no trabalho de Menetrey et al. (1999) que realizaram o mesmo procedimento lesivo no músculo gastrocnêmio de camundongos. Conforme esses autores, a regeneração parcial do músculo no camundongo resultou em diminuição de 65% na função contrátil, quatro semanas após a lesão (MENETREY et al., 1999). Em nosso modelo, a redução foi de 54%.

O processo de regeneração foi acompanhado de aumento da razão entre os ácidos oleico/ esteárico e palmitoleico/ palmítico, indicadores da atividade de dessaturase. Houve aumento na massa do músculo EDL na mesma pata, devido à diminuição da função contrátil do músculo gastrocnêmio após laceração. Ocorreu diminuição das forças isotônica específica e tetânicas absoluta e específica e queda da resistência à fadiga e aumento da área de tecido fibroso (Figura 14B, Figura 14C, Figura 14D e Figura 19). Esses achados são indicativos de regeneração incompleta e recuperação parcial da função contrátil do músculo lesionado (CHAN et al., 2010; HWANG et al., 2013; PARK et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; PIEDADE et al., 2008; TURNER et al., 2012).

A suplementação com o ácido linoleico aumentou o conteúdo de ácidos graxos (n-6) (eicosatrienóico e araquidônico) no músculo contralateral; diminuiu a massa, a força isotônica específica, a resistência à fadiga e a área de secção transversa das fibras dos músculos gastrocnêmios contralateral e lesionado; reduziu a força tetânica específica e elevou o conteúdo de *p-S6* e *Pax7* no músculo contralateral; aumentou a área de tecido fibroso e reduziu o conteúdo de *alfa actina* no músculo lesionado. O tratamento de fibroblastos com ácido linoleico diminuiu a expressão de mRNA de *PCNA*, colágeno e fibronectina. A suplementação com o ácido oleico não modificou a massa e a área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio; aboliu a diminuição da força isotônica específica e o aumento da área de tecido fibroso induzidos pela lesão; preveniu a queda das forças tetânica, absoluta e específica, e aumentou a resistência à fadiga e o conteúdo de vimentina nos músculos gastrocnêmios contralateral e lesionado. O tratamento com ácido oleico *in vitro* aumentou o conteúdo de mRNA de *MyoD* em mioblastos, de desmina em miotubos já diferenciados e inibiu a expressão de mRNA de *PCNA*, colágeno e fibronectina em fibroblastos (Figura 27A, Figura 28A e Figura 29A, Figura 30A, Figura 30B) .

Em estudo prévio do nosso grupo observamos que a miogênese *in vitro* é acompanhada por alterações na composição de ácidos graxos em mioblastos e miotubos. O tratamento com ácido oleico (100 μ M) promoveu aumento no conteúdo de ácido esteárico, palmítico, linoleico, oleico, DHA, linolênico, palmitoleico e araquidônico. Em miotubos, houve diminuição (14%) no conteúdo total de ácidos graxos saturados e aumento de 24% no conteúdo total de ácidos graxos insaturados, ocorrendo aumento (27%) do índice de dessaturação. Nesse mesmo estudo, ocorreram diminuição do conteúdo dos ácidos palmítico e esteárico e elevação do conteúdo de ácido oleico e da atividade e expressão (mRNA) da delta 9-dessaturase. Antes da indução de diferenciação, o tratamento com ácido oleico diminuiu a taxa de proliferação de células-tronco satélites e, após indução de diferenciação, promoveu aumento do diâmetro de miotubos (PINHEIRO, 2012).

Nos experimentos *in vitro*, observamos que o ácido oleico modula os fatores que regulam a miogênese (*MyoD*, *miogenina* e *Myf6*). O ácido oleico aumentou a expressão (mRNA) de *MyoD* em mioblastos e elevou o conteúdo (mRNA) de desmina em miotubos. A expressão aumentada de *MyoD* em células musculares indiferenciadas inibe o ciclo celular (proliferação) e direciona estas células para a diferenciação miogênica (WANG; RUDNICKI, 2011). A desmina é um filamento intermediário ancorado às linhas Z dos sarcômeros que compõem o arcabouço do aparato contrátil muscular (BÄR et al., 2004). A desmina e a vimentina são os primeiros marcadores proteicos de tecido muscular durante a embriogênese e diferenciação (PAULIN; LI, 2004). A elevação do conteúdo de vimentina observado acompanha o aumento da força e resistência à fadiga muscular observados no tratamento com o ácido oleico.

Apesar dos estudos *in vitro* com células musculares de linhagem (C2C12 e L6) serem sugestivos de que os ácidos linoleico ou oleico estimulam a proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos (HURLEY et al., 2006; LEE et al., 2009; MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2013; ZHANG et al., 2012), em nosso estudo, durante a regeneração, os animais suplementados com o ácido linoleico apresentaram diminuição da massa do músculo gastrocnêmio, tanto na pata contralateral (não lesionada) quanto na lesionada. O ácido linoleico também causou diminuição da massa do músculo sóleo que é sinergista à ação do gastrocnêmio. Por outro lado, a suplementação com ácido oleico não modificou a massa do músculo gastrocnêmio e elevou a do EDL, que possui função antagônica a dos

músculos gastrocnêmio e sóleo sendo, portanto, intensamente recrutado para compensar a diminuição da contratilidade dos músculos antagonistas durante a regeneração.

Lee et al. (2009) detectaram *in vitro* aumento da fosforilação de *ERK 1/2 MAPK* durante a diferenciação de células C2C12 tratadas com os ácidos linoleico, oleico e *cis9,trans11* ácido linoleico conjugado (CLA). Em estudos sobre os efeitos dos ácidos graxos em outros tipos celulares foi mostrada modulação na sinalização das MAPKs (ALEXANDER et al., 2001), nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} (GAILLY, 1998; WOOLCOTT et al., 2006) e concentrações de Na^+ e K^+ (FANG et al., 2011; GU et al., 2009; KEHL, 2001). Contudo, em nosso estudo, os efeitos dos ácidos linoleico ou oleico sobre a morfologia e função contrátil parecem não envolver fosfo-NF-kappaB ou fosfo-44-42 MAPK.

Hurley et al. (2006), verificaram que os ácidos linoleico, oleico e *cis9,trans11* CLA estimulam a diferenciação de mioblastos L6, enquanto que o ácido palmítico e *trans10,cis12* CLA inibiram a diferenciação. Os autores sugerem que a presença de dupla ligação na posição *cis* 9 deve ser determinante para a diferenciação miogênica. Em nosso estudo, o processo de regeneração do músculo gastrocnêmio foi acompanhado de aumento do índice de atividade de delta-9 dessaturase conforme indicado pelo aumento das razões de palmitoleico/ palmítico e oleico/ esteárico.

A composição de ácidos graxos nos tecidos, incluindo o músculo esquelético, é influenciada pela composição de ácidos graxos na dieta (LI et al., 2007; MACHADO et al., 2011; MANN et al., 2011). Em nosso estudo, o ácido linoleico comprometeu a regeneração do músculo esquelético lesionado, elevando o conteúdo de ácido araquidônico, causando redução da área de secção transversa da fibra muscular e elevação de tecido fibroso, comprometendo a função contrátil, contraditoriamente aos efeitos benéficos dos ácidos graxos n-3 reportados por Machado et al. (2011) em animais com distrofia muscular. Nesse trabalho, os autores observaram que a suplementação com EPA por 16 dias diminui os marcadores de mionecrose no plasma (atividade da creatina quinase) e no tecido muscular reduzindo também parâmetros inflamatórios, como o conteúdo de TNF- α (MACHADO et al., 2011). Condizente com Machado et al. (2011), efeito benéfico também foi reportado em hamsters distróficos devido à deficiência de sarcoglicana- δ após a administração de ácido alfa-linolênico (FIACCAVENTO et al., 2010).

A diminuição da resistência à fadiga e força no músculo dos animais suplementados com ácido linoleico pode estar correlacionada ao aumento dos ácidos eicosatrienóico e araquidônico observado em nosso estudo, contudo, não envolveu alteração nos conteúdos das ubiquitinas E3 ligases (MuRF1 e Atrogina-1) que não se modificaram com a lesão ou tratamento com ácido linoleico (BODINE; BAEHR, 2014).

Tamilarasan et al. (2012) induziram sobrecarga lipídica no músculo esquelético de camundongos com superexpressão de lipase de lipoproteína (LPL). Condizente com os resultados de suplementação do ácido linoleico, neste estudo, houve redução da massa dos músculos gastrocnêmio e quadríceps, aumento do número de sarcômeros danificados e miofibrilas mal definidas, ocorreu degradação de proteínas e lipoapoptose (analisadas pela atividade das caspases 3 e 7 e de proteassoma), diminuição da regeneração (lesão induzida por cardiotoxina) e diminuição da área transversa do músculo após lesão. Neste mesmo trabalho, os pesquisadores observaram em células C2C12 *in vitro* a diminuição do índice de fusão de mionúcleos, redução de células satélites (pela expressão de Pax7) e de fatores que regulam a miogênese (pela expressão de *MyoD* e miogenina).

Consistente com os trabalhos que avaliaram o efeito estimulador do ácido oleico sobre a diferenciação de células musculares *in vitro* (HURLEY et al., 2006; LEE et al., 2009; MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2013; ZHANG et al., 2012), no estudo *in vivo*, verificamos que além de abolir a queda da força e resistência à fadiga e elevar o conteúdo de proteínas de citoesqueleto, este ácido graxo preveniu o aumento da área de tecido fibroso durante a regeneração. Este efeito pode estar associado à uma elevação do conteúdo de MyoD e desmina e diminuição de PCNA, colágeno e fibronectina nos estágios iniciais da regeneração, conforme observado em fibroblastos tratados com ácido oleico.

A proliferação exacerbada de fibroblastos no músculo muscular leva à deposição excessiva de tecido conjuntivo na matriz extracelular, restringindo a difusão de nutrientes para a miofibrila. Assim, alterações mecânicas e estruturais decorrentes da regeneração incompleta estão associadas ao desenvolvimento de fibrose, perda de força e elasticidade do músculo (KAARIANEN et al., 2000; KRAUSE et al., 2010; WANG et al., 2009). Essas alterações foram exacerbadas pela administração do ácido linoleico.

A fibrose muscular está também associada a alteração na composição de lipídios no sarcolema, podendo afetar processos de lesão e degeneração das miofibras. No músculo esquelético de camundongos distróficos, em que ocorre perda de proteínas de citoesqueleto e elevação de tecido fibroso, há menor conteúdo de ácido palmítico e aumento no conteúdo de ácido oléico na fração de fosfolipídios comparado a camundongos sem distrofia muscular (CARROLL et al., 1985). Em amostras de tecido muscular obtidas por biópsia em pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD), observa-se diminuição do conteúdo de ácido linoleico e aumento do conteúdo de ácido oléico, como reportado anteriormente em modelos animais (KUNZE et al., 1975; PEARCE; KAKULAS, 1980). Em nossos experimentos, o ácido oleico atenuou a diminuição da função contrátil e o aumento de tecido fibroso enquanto que o ácido linoleico acentuou esse quadro ao final de quatro semanas de regeneração do músculo lacerado.

Hu et al. (2010) avaliaram o efeito de uma dieta rica em gordura (Hfd) na regeneração muscular. Condizente com nossos resultados *in vivo*, os autores observaram decréscimo da massa do músculo tibial anterior (TA) induzida por cardiotoxina, diminuição da área transversa das miofibras detectadas por hematoxilina-eosina (HE), aumento da fibrose muscular, avaliada por *Picro Sirius Red*, redução da expressão (mRNA) de filamentos intermediários de citoesqueleto (desmina) e retardo da regeneração muscular. Os autores observaram ainda aumento do conteúdo de p-Akt e p-S6k1 e supressão da ativação da proliferação de células satélites. Em nosso estudo, houve ativação da via de sinalização da síntese proteica (observada pela fosforilação de S6) no músculo contralateral dos animais suplementados com ácido linoleico, possivelmente de proteínas de matriz extracelular (analisada pelo método de *Picro Sirius Red*), resultando assim em aumento da área de fibrose e consequente redução da força e resistência à fadiga. A elevação do conteúdo de Pax7, observada no músculo contralateral dos animais suplementados com ácido linoleico, é sugestivo de que células satélites estão sendo geradas provavelmente na tentativa de repor a perda de massa. Os resultados de expressão de Pax7 corroboram ainda com a diminuição do conteúdo de miofibras recém formadas, avaliada pelo conteúdo de alfa actina, no músculo lesionado dos animais suplementados com ácido linoleico. Os resultados descritos são compatíveis com aqueles descritos por outros, em que ciclos constantes de regeneração/degeneração observados em miopatias crônicas e no envelhecimento

promovem elevação da expressão de Pax7 e perda da habilidade das células satélites em reparar os danos das fibras musculares (BRACK et al., 2005; CHAKKALAKAL et al., 2012; COLLINS et al., 2007; CONBOY et al., 2005; SHEFER et al., 2006).

Tuazon e Henderson (2012) avaliaram a composição de ácidos graxos em fosfolipídeos no músculo de camundongos distróficos mdx. Os pesquisadores observaram diminuição da força, elevação da atividade da creatina quinase (CK) (dano ao sarcolema), da carbonilação de proteínas (estresse oxidativo) e do conteúdo de TNF alfa (inflamação) em relação aos animais controles. Os autores concluíram que as alterações observadas na função muscular estavam associadas ao aumento do ácido linoleico e diminuição dos ácidos DHA e alfa linolênico (ALA) em fosfolipídeos de membrana do músculo esquelético. De modo semelhante ao nosso estudo, encontraram elevação da composição de ácido araquidônico nos músculos dos animais suplementados com ácido linoleico (precursor de ácido araquidônico).

Agley et al. (2013) descreveram o potencial adipogênico e fibrogênico de células miogênicas e fibroblastos isolados do músculo esquelético. Dois tratamentos foram utilizados: (1) ácido oleico e palmítico e (2) um meio de cultura indutor de adipogênese. Os autores observaram que os fibroblastos (72 horas após isolamento) e células não miogênicas, tratados com ácido oleico (300 μ M), apresentam forte potencial adipogênico e síntese elevada de proteínas de matriz extracelular. Em nosso estudo, porém, o tratamento de fibroblastos com ambos os ácidos graxos (linoleico ou oleico) promoveu diminuição do conteúdo de mRNA de *PCNA* e redução dos conteúdos de mRNA de colágeno e fibronectina (proteínas de matriz extracelular). Dessa forma, a ação do ácido oleico parece estar ligada à modulação da diferenciação em células-tronco satélites e síntese de desmina em miotubos *in vitro* e de vimentina *in vivo*.

8 CONCLUSÕES

No presente estudo, concluímos que a suplementação com o ácido linoleico comprometeu a regeneração do músculo esquelético lesionado, causando redução da massa muscular, elevação de tecido fibroso, recuperação parcial da função contrátil. O ácido oleico, por sua vez, atenuou o quadro de reparo incompleto, otimizando a capacidade regenerativa e a função contrátil do músculo lesionado. O mecanismo de ação do ácido oleico envolve aceleração da expressão de *MyoD* em células-tronco satélites e de desmina em miotubos diferenciados.

Figura 31: **Representação esquemática dos resultados obtidos.** Estão indicadas as alterações que ocorreram no processo de regeneração *per se* e os efeitos dos tratamentos com os ácidos linoleico e oleico *in vivo*. Os efeitos *in vitro* dos ácidos graxos nos mioblastos, miotubos e fibroblastos também estão indicados. Proteína de determinação mioblástica (*MyoD*); Fator miogênico 6 (*Myf6*); *Tripartite motif-containing protein* (*TRIM32*); Antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA*); Extensor digital longo (*EDL*); *Paired box 7* (*Pax7*)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- AARIMAA, V.; KAARIANEN, M. S.; VAITTINEN, J.; TANNER, T.; JARVINEN, T. Best et al. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. **Neuromuscul. Disord.**, v. 14, p. 421–428, 2004.
- ABBOTT, S. K.; ELSE, P. L.; HULBERT, A. J. Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. **Br. J. Nutr.**, v. 103, p. 522–529, 2010.
- AGLEY, C. C.; ROWLERSON, A. M.; VELLOSO, C. P.; LAZARUS, N. R.; HARRIDGE, S. D. Human skeletal muscle fibroblasts, but not myogenic cells, readily undergo adipogenic differentiation. **J. Cell Sci.**, v. 126, pt. 24, p. 5610–5625, 2013.
- ALEXANDER, L. D.; CUI, X. L.; FALCK, J. R.; DOUGLAS, J. G. Arachidonic acid directly activates members of the mitogen-activated protein kinase superfamily in rabbit proximal tubule cells. **Kidney Int.**, v. 59, p. 2039–2053, 2001.
- ALLBROOK, D. An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. **J. Anat.**, v. 96, p. 137–152, 1962.
- ALLEN, R. E.; LUITEN, L. S.; DODSON, M. V. Effect of insulin and linoleic acid on satellite cell differentiation. **J. Anim. Sci.**, v. 60, n. 6, p. 1571–1579, 1985.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; LIM, D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, v. 41, p. 683, 2004.
- ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A.; KOMAKI, M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. **Differentiation**, v. 68, p. 245, 2001.
- BENTZINGER, C. F.; VON MALTZAHN, J.; RUDNICKI, M. A. Extrinsic regulation of satellite cell specification. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 26, n.1, p. 27, 2010.
- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; VON MALTZAHN, J.; SOLEIMANI, V. D.; YIN, H.; RUDNICKI, M. A. Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. **Cell Stem Cell.**, v. 12, n. 2, p. 75–87, 2013.
- BEST, T.; GARRETT, W. E. Muscle and tendon. In: DELEE, J. C.; DREZ, D. Jr. (Ed.). **Orthopaedic sports medicine: principles and practice**. Philadelphia: WB Saunders Co., 1994. v. 12, p. 41–45.
- BISCHOFF, R. The satellite cell and muscle regeneration. In: ENGEL, A. G.; FRANZIN-AMSTRONG, C. (Ed.). **Myology: basic and clinical**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Publishing Co, 1994. p. 97–118.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 289, p. G381, 2005.

BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 15, n. 6, p. 469-484, 2014.

BONDESEN, B. A.; JONES, K. A.; GLASGOW, W. C.; PAVLATH, G. K. Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. **FASEB J.**, v. 21, p. 3338–3345, 2007.

BONDESEN, B. A.; MILLS, S. T.; KEGLEY, K. M.; PAVLATH, G. K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. C465–C483, 2004.

BONDESEN, B. A.; MILLS, S. T.; PAVLATH, G. K. The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 290, p. C1651–C1659, 2006.

BORKMAN, M.; STORLIEN, L. H.; PAN, D. A.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J.; CAMPBELL, L. V. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 238–244, 1993.

BORNEMANN, A.; SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. **Muscle Nerve**, v. 15, n. 1, p.14-20, 1992.

BRACK, A. S.; CONBOY, I. M.; CONBOY, M. J.; SHEN, J.; RANDO, T. A. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 50-59, 2008.

BRACK, A. S.; CONBOY, M. J.; ROY, S.; LEE, M.; KUO, C. J.; KELLER, C.; RANDO, T. A. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. **Science**, v. 317, n. 5, p. 807-810, 2007.

BRACK, A. S.; BILDSOE, H.; HUGHES, S. M. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. **J. Cell Sci.**, v. 118, p. 4813–4821, 2005.

BRAUN, T.; BOBER, E.; WINTER, B.; ROSENTHAL, N.; ARNOLD, H. H. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. **EMBO J.**, v. 9, p. 821-831, 1990a.

BRAUN, T.; BUSCHHAUSEN-DENKER, G.; BOBER, E.; TANNICH; ARNOLD, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. **EMBO J.**, v. 8, p. 701–709, 1989.

BRIOLAY, A.; JAAFAR, R.; NEMOZ, G.; BESSUEILLE, L. Myogenic differentiation and lipid-raft composition of L6 skeletal muscle cells are modulated by PUFAs. **Biochim. Biophys. Acta**, v.10, p. 2-9, 2013.

BROCKS, L.; JAP, P. H.; RAMAEKERS, F. C.; STADHOUDERS, A. M. Vimentin and desmin expression in degenerating and regenerating dystrophic murine muscles. **Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v. 61, n. 2, p. 89-96, 1991.

BUCKINGHAM, M. Making muscle in mammals. **Trends Genet.**, v. 8, p. 144–148, 1992.

BUCKWALTER, J. A.; EINHORN, T. A.; BOLANDER, M. E.; et al. Healing of the musculoskeletal tissues. In: ROCKWOOD, C. A.; GREEN, D. P.; BUCHOLZ, R. W. (Ed.). **Fracture in adults**. 4th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. v. 5, p. 261–304.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgrad. Med.**, v. 121, n. 6, p. 148-157, 2009.

CARLSON, B. M.; FAULKNER, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 15, p. 187–196, 1983.

CAROSIO, S.; BERARDINELLI, M. G.; AUCELLO, M.; MUSARO, A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Res. Rev.**, v. 10, p. 35–42, 2011.

CARROLL, J. E.; NORRIS, B. J.; BROOKE, M. H. Defective [U-14 C] palmitic acid oxidation in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 35, n. 1, p. 96-97, 1985.

CASTILLERO, E.; MARTIN, A. I.; LOPEZ-MENDUINA, M.; VILLANUA, M. A.; LOPEZ-CALDERON, A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogen-1 and on myogenic regulatory factors. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 297, p. 1322–1331, 2009.

CHAKKALAKAL, J. V.; JONES, K. M.; BASSON, M. A.; BRACK, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. **Nature**, v. 18, n. 490, p. 355-360, 2012.

CHAKRAVARTHY, M. V.; ABRAHA, T. W.; SCHWARTZ, R. J.; FIOROTTO, M. L.; BOOTH, F. W. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 17, n. 46, p. 275, 2000.

CHAN, Y. S. et al. Using low-intensity pulsed ultrasound to improve muscle healing after laceration injury: an in vitro and in vivo study. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 36, p. 743–751, 2010.

CHAN, Y. S.; LI, Y.; FOSTER, W.; HORAGUCHI, T.; SOMOGYI, G.; FU, F. H.; HUARD, J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 2, p.771-80, 2003.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 209–238, 2004.

CHEEK, D. B.; POWELL, G. K.; SCOTT, R. E. Growth of muscle mass and skeletal collagen in the rat. ii. the effect of ablation of pituitary, thyroid or testes. **Bull Johns Hopkins Hosp.**, v. 116, p. 387-395, 1965.

COLLINS, C. A. Satellite cell self-renewal. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, p. 301, 2006.

COLLINS, C. A.; OLSEN, I.; ZAMMIT, P. S.; HESLOP, L.; PETRIE, A.; PARTRIDGE, T. A.; MORGAN, J. E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**, v. 122, p. 289, 2005.

COLLINS, C. A.; ZAMMIT, P. S.; RUIZ, A. P.; MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. **Stem Cells**, v. 25, p. 885–894, 2007.

CONBOY, I. M. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. **Nature**, v. 433, p. 760–764, 2005.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. **Dev. Cell**, v. 3, p. 397, 2002.

CONTE, T. C.; FRANCO, D. V.; BAPTISTA, I. L.; BUENO, C. R. Jr.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BRUM, P. C.; MORISCOT, A. S.; MIYABARA, E. H. Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. **Toxicol.**, v. 52, n. 1, p.146-55, 2008.

COSSU, G.; ZANI, B.; COLETTA, M.; BOUCHÈ, M.; PACIFICI, M.; MOLINARO, M. In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. **Cell Differ.**, v. 9, n. 6, p. 357-368. 1980.

CSETE, M.; WALIKONIS, J.; SLAWNY, N.; WEI, Y.; KORSNES, S.; DOYLE, J. C.; WOLD, B. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. **J. Cell. Physiol.**, p. 186-189, 2001.

CURI, R. **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 857 p. ISBN 9788527715591.

DAS, U. N. Essential Fatty acids - a review. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 7, n. 6, p. 467-482, 2006a.

DAS, U. N. Leucocyte activation in coronary heart disease: but how and why? **Biotechnol. J.**, v. 29, n. 18, p. 2317-2318, 2008.

DAS, U. N. Obesity: genes, brain, gut, and environment. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 459-473, 2010.

DAS, U. N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnol. J.**, v. 1, n. 4, p. 420-439, 2006b.

DAVID, J. D.; HIGGINBOTHAM, C. A. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: interactions of prostaglandin E1, adenosine 3':5' monophosphate, and calcium influx. **Dev. Biol.**, v. 82, p. 308-316, 1981.

DAVIS, R. L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. **Cell**, v. 51, p. 987-1000, 1987.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; VANDENABEELE, F.; VERMEESCH, J. R.; RAYMACKERS, J. M.; LUYTEN, F. P. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 909, 2003.

DE LORGERIL, M. Mediterranean diet and cardiovascular disease: historical perspective and latest evidence. **Atheroscler. Rep.**, v. 15, n. 12, p. 370, 2013.

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; BERTRAND, L.; HESPEL, P.; HUE, L.; FRANCAUX, M. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 293, n. 4, p. C1263-1271, 2007.

DUGUEZ, S.; FÉASSON, L.; DENIS, C.; FREYSSINET, D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, n. 4, p. 802-809, 2002.

DUPOUY, V. M.; FERRE, P. J.; URO-COSTE, E.; LEFEBVRE, H. P. Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 100, p. 233-239, 2006.

EDMONDSON, D. G.; OLSON, E. N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. **Genes Dev.**, v. 3, p. 628-640, 1989.

ENTWISTLE, A.; CURTIS, D. H.; ZALIN, R. J. Myoblast fusion is regulated by a prostanoid of the one series independently of a rise in cyclic AMP. **J. Cell Biol.**, v. 103, p. 857-866, 1986.

FANG, Y. J.; ZHOU, M. H.; GAO, X. F.; GU, H.; MEI, Y. A. Arachidonic acid modulates Na⁺ currents by non-metabolic and metabolic pathways in rat cerebellar granule cells. **Biochem. J.**, v. 438, p. 203-215, 2011.

FERRANTE, M. I.; KIFF, R. M.; GOULDING, D. A.; STEMPLE, D. L. Troponin T is

essential for sarcomere assembly in zebrafish skeletal muscle. **J. Cell Sci.**, v. 15, n. 124, p. 565-577, 2011.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 6, p. 1528-1530, 1998.

FERREIRA, R.; NEUPARTH, M. J.; ASCENSAO, A.; MAGALHAES, J.; VITORINO, R.; DUARTE, J. A.; AMADO, F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first wk of hindlimb suspension. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 97, p. 340-346, 2006.

FIACCAVENTO, R.; CAROTENUTO, F.; VECCHINI, A.; BINAGLIA, L.; FORTE, G.; CAPUCCI, E.; MACCARI, AM.; MINIERI, M.; DI NARDO, P. An omega-3 fatty acid-enriched diet prevents skeletal muscle lesions in a hamster model of dystrophy. **Am. J. Pathol.**, v. 177, n. 5, p. 2176-2184, 2010.

FOIDART, M.; FOIDART, J. M.; ENGEL, W. K. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. **Arch. Neurol.**, v. 38, p. 152-157, 1981.

FOSTER, W.; LI, Y.; USAS, A.; SOMOGYI, G.; HUARD, J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. **J. Orthop. Res.**, v. 21, p. 798-804, 2003.

FRE, S.; HUYGHE, M.; MOURIKIS, P.; ROBINE, S.; LOUVARD, D.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. **Nature**, v. 435, p. 964, 2005.

FREITAS, J. J. S.; KIETZER, K. S. **Sistema neuromuscular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. v. 9, p. 229-234.

FREITAS, L. S.; FREITAS, T. P.; SILVEIRA, P. C.; ROCHA, L. G.; PINHO, R. A.; STRECK, E. L. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. **Cell Biol. Int.**, v. 31, p. 482-488, 2007.

FUKADA, S.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TSUKIHARA, H.; YUASA, K.; HIGUCHI, S.; ONO, S.; TSUJIKAWA, K.; TAKEDA, S.; YAMAMOTO, H. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 1285, 2002.

FUKADA, S.; UEZUMI, A.; IKEMOTO, M.; MASUDA, S.; SEGAWA, M.; TANIMURA, N.; YAMAMOTO, H.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. **Stem Cells**, v. 25, p. 2448-2459, 2007.

FUKUSHIMA, K.; BADLA, N.; USAS, A.; RIANO, F.; FU, F.; HUARD, J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **Am. J. Sports Med.**, v. 29, n. 4, p. 394-402, 2001.

GAILLY, P. Ca²⁺ entry in CHO cells, after Ca²⁺ stores depletion, is mediated by arachidonic acid. **Cell Calcium**, v. 24, p. 293-304, 1998.

GANG, E. J.; JEONG, J. A.; HONG, S. H.; HWANG, S. H.; KIM, S.W.; YANG, I.H.; AHN, C.; HAN, H.; KIM, H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 22, p. 617, 2004.

GAO, Y.; KOSTROMINOVA, T. Y.; FAULKNER, J. A.; WINEMAN, A. S. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. **J. Biomech.**, v. 41, p. 465–469, 2008.

GARRETT, W. E.; SEABER JR, A. V.; BOSWICK, J.; URBANIAK, J. R.; GOLDNER, J. L. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. **J. Hand Surg.**, v. 9, n. 5, p. 683-692, 1984.

GILDA, J. E.; GOMES, A. V. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 15, n. 2, p. 186-188, 2013.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J. W. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem Cells Dev.**, n. 16, v. 5, p. 857-868, 2007.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J. W. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 15, n. 2, p. 186-188, 2013.

GRETCHEN, A. M.; LIEBER, R. L. Skeletal muscle fibrosis develops in response to desmin deletion. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 302, p. 1609–1620, 2012.

GU, H.; FANG, Y. J.; HE, Y. L.; SUN, J.; ZHU, J.; MEI, Y. A. Modulation of muscle rNaV1.4 Na⁺ channel isoform by arachidonic acid and its non-metabolized analog. **J. Cell Physiol.**, v. 219, p. 173–182, 2009.

HAMAIN NAKAMURA, M.; ASANO, A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C2C12 myoblast differentiation. **Cell Struct. Funct.**, v. 22, n. 4, p. 421-431, 1997.

HANNAFIN, J. A. et al. Adipose-derived stem cell therapy for severe muscle tears in working German shepherds. Título. In: GRIFFIN, L. Y. (Ed.). **Orthopaedic Knowledge Update. Sports Medicine**. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994. v. 4, p. 17–33.

HARDEN, C. J.; DIBLE, V. A.; RUSSELL, J. M.; GARAIOVA, I.; PLUMMER, S. F.; BARKER, M. E.; CORFE, B. M. **Nutr. Res.**, v. 34, n. 1, p. 17-24, 2014.

HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J. H.; EDMONDSON, D. G.; VENUTI, J. M.; OLSON, E. N.; KLEIN, W. H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v. 364, p. 501–506, 1993.

HERZBERG, N. H.; ZWART, R.; WOLTERMAN, R. A.; RUITER, J. P.; WANDERS, R. J.; BOLHUIS, P. A.; VAN DEN BOGERT, C. Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts. **Biochim. Biophys Acta**, v. 24, n. 1, p. 63-67, 1993.

HIRABARA, S. MASSAO.; S. DE OLIVEIRA CARVALHO, C. R.; MENDONÇA, J. R.; PILTCHER HABER, E.; FERNANDES, L. C.; CURI, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). **FEBS Lett.**, v. 24, n. 3, p. 109-114, 2003.

HIRSINGER, E.; MALAPERT, P.; DUBRULLE, J.; DELFINI, M. C.; DUPREZ, D.; HENRIQUE, D.; ISH-HOROWICZ, D.; POURQUIE, O. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. **Development**, v. 128, p. 107, 2001.

HLAIS, S.; EL-BISTAMI, D.; EL RAHI, B.; MATTAR, M. A.; OBEID, O. A. Combined fish oil and high oleic sunflower oil supplements neutralize their individual effects on the lipid profile of healthy men. **Lipids**, v. 48, n. 9, p. 853-861, 2013.

HOLNESS, M. J.; LANGDOWN, M. L.; SUGDEN, M. C. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. **Biochem. J.**, v. 1, n. 3, p. 657-665, 2000.

HORSLEY, V.; JANSEN, K. M.; MILLS, S. T.; PAVLATH, G. K. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. **Cell**, v. 113, p. 483-494, 2003.

HORSLEY, V.; PAVLATH, G. K. Prostaglandin F₂ α stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. **J. Cell Biol.**, v. 161, p. 111–118, 2003.

HORWITZ, A. F.; WIGHT, A.; LUDWIG, P.; CORNELL, R. Interrelated lipid alterations and their influence on the proliferation and fusion of cultured myogenic cells. **J. Cell Biol.**, v. 77, n. 2, p. 334-357, 1978.

HU, Z.; WANG, H.; LEE, I. H.; MODI, S.; WANG, X.; DU, J.; MITCH, W. E. PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 59, n. 6, p. 1312-1320, 2010.

HURLEY, M. S.; FLUX, C.; SALTER, A. M.; BRAMELD, J. M. Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation in vitro. **Br. J. Nutr.**, v. 95, n. 3, p. 623-630, 2006.

HURME, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 24, n. 2, p. 197-205, 1992.

HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, H.; et al. Healing of skeletal muscle injury: An ultrastructural and immunohistochemical study. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, p. 801–810, 1991.

HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, n. 7, p. 801-810, 1991.

HURME, T.; KALIMO, H.; SANDBERG, M.; et al. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. **Lab. Invest.**, v. 64, p. 76–84, 1991.

HWANG, J. H.; KIM, I. G.; PIAO, S.; JUNG, A. R.; LEE, J. Y.; PARK, K. D. Combination therapy of human adipose-derived stem cells and basic fibroblast growth factor hydrogel in muscle regeneration. **Biomaterials**, v. 34, p. 6037–6045, 2013.

HWANG, J. H.; RA, Y. J.; LEE, K. M.; LEE, J. Y.; GHIL, S. H. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 87, p. 20–26, 2006.

JACKSON, M. J.; BROOKE, M. H.; KAISER, K.; EDWARDS, R. H. Creatine kinase and prostaglandin E2 release from isolated Duchenne muscle. **Neurology**, v. 41, p. 101–104, 1991.

JAHNKE, V. E.; SABIDO, O.; FREYSSENET, D. Control of mitochondrial biogenesis, ROS level, and cytosolic Ca²⁺ concentration during the cell cycle and the onset of differentiation in L6E9 myoblasts. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 296, n. 5, p. 1185–1194, 2008.

JANSEN, K. M.; PAVLATH, G. K. Prostaglandin F₂α promotes muscle cell survival and growth through upregulation of the inhibitor of apoptosis protein BRUCE. **Cell Death Differ.**, v. 15, n. 10, p. 1619–1628, 2008.

JÄRVINEN, M.; SORVARI, T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscle. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v. 83A, p. 259–265, 1975.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. **Muscles Ligaments Tendons J.**, v. 4, n. 24, p. 337–345, 2014.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am. J. Sports Med.**, v. 33, p. 745–764, 2005.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; AARIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, H. Muscle injuries: optimising recovery. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 21, p. 317–331, 2007.

JARVINEN, T. A.; KAARIAINEN, M.; JARVINEN, M.; KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 12, p. 155–161, 2000.

JOE, A. W.; YI, L.; NATARAJAN, A.; LE GRAND, F.; SO, L.; WANG, J.; RUDNICKI, M. A.; ROSSI, F. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. **Nat. Cell Biol.**, v. 12, n. 2, p. 153–163, 2010.

JOE, A. W.; YI, L.; NATARAJAN, A.; LE, GRAND, F.; SO, L.; WANG, J.; RUDNICKI, M. A.; ROSSI, F. M. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. **Nat. Cell Biol.**, v. 12, p. 153–163, 2010.

JU-HYE, L.; HIROFUMI, T.; YOSHIKO, M.; YOSHINORI, F.; KOJI, Y. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. **Life Sciences**, v. 84, p. 415–420, 2009.

KAAR, J. L.; LI, Y.; BLAIR, H. C.; ASCHE, G.; KOEPESEL, R. R.; HUARD, J. et al. Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis. **Acta Biomater.**, v. 4, p. 1411–1420, 2008.

KAARIAINEN, M.; JARVINEN, T.; JARVINEN, M.; RANTANEN, J.; KALIMO, H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 10, p. 332–337, 2000.

KAARIAINEN, M.; KAARIAINEN, J.; JARVINEN, T. L.; SIEVANEN, H.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. **J. Orthop. Res.**, v. 16, p. 197–206, 1998.

KANG, L.; AYALA, J. E.; LEE-YOUNG, R. S.; ZHANG, Z.; JAMES, F. D.; NEUFER, P. D.; POZZI, A.; ZUTTER, M. M.; WASSERMAN, D. H. Diet-induced muscle insulin resistance is associated with extracellular matrix remodeling and interaction with integrin $\alpha 2 \beta 1$ in mice. **Diabetes**, v. 60, p. 416–426, 2011.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; DAY, C. S.; et al. Biologic intervention in muscle healing and regeneration. **Sports Med. Arthrosc. Rev.**, v. 6, p. 95–102, 1998b.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; DAY, C. S. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. **Cell Transplantation**, v. 6, p. 585–598, 1998a.

KEHL, S. J. Eicosatetraenoic acid (ETYA), a non-metabolizable analogue of arachidonic acid, blocks the fast-inactivating potassium current of rat pituitary melanotrophs. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 79, p. 338–345, 2001.

KELLEY, D. S.; BARTOLINI, G. L.; NEWMAN, J. W.; VEMURI, M.; MACKEY, B. E. Influence of dietary fatty acids on human health with emphasis on immune and inflammatory responses. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 74, p. 331–338, 2006.

KELLEY, D. S.; TAYLOR, P. C.; NELSON, G. J.; MACKEY, B. E. Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. **Lipids**, v. 33, p. 125–130, 1998.

KENNETH, J.; LIVAKA THOMAS, D.; SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Method**, v. 25, n. 4, 2001.

KIMBALL, S. R.; SHANTZ, L. M.; HORETSKY, R. L.; JEFFERSON, L. S. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *v. 23, n. 17, p. 11647-11652, 1999.*

KONIGSBERG, U. R.; LIPTON, B. H.; KONIGSBERG, I. R. The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro. **Dev. Biol.**, v. 45, n. 2, p. 260-275, 1975.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatr. Diabetes**, v. 12, n. 4, p. 345-364, 2010.

KUNZE, D.; REICHMANN, G.; EGGER, E.; OLTHOFF, D.; DÖHLER, K. Fatty acid pattern of lipids in normal and dystrophic human muscle. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 21, n. 6, p. 471-475, 1975.

LA BARGE, M. A.; BLAU, H. M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. **Cell.**, v. 15, n. 4, p. 589-601, 2002.

LEE, J. H.; TACHIBANA, H.; MORINAGA, Y.; FUJIMURA, Y.; YAMADA, K. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. **Life Sci.**, v. 27, n. 84, p. 415-420, 2009.

LEPPER, C.; PARTRIDGE, T. A.; FAN, C. M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. **Development**, v. 138, p. 3639–3646, 2011.

LI, Z. B.; KOLLIAS, H. D.; WAGNER, K. R. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 19371–19378, 2008.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 1007–1019, 2004.

LI, Y.; HUARD, J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. **Am J. Pathol.**, v. 161, p. 895–907, 2002.

LI, Y.; LI, J.; ZHU, J.; SUN, B.; BRANCA, M.; TANG, Y.; FOSTER, W.; XIAO, X.; HUARD, J. Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. **Mol. Ther.**, v. 15, n. 9, p. 1616-1622, 2007.

Lieber, R. L.; Ward, S. R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 1, n. 3, p. 241-252, 2013.

LIU, S.; BARACOS, V. E.; QUINNEY, H. A.; Clandinin, M. T. Dietary omega-3 and polyunsaturated fatty-acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal muscle sarcolemma. **Biochem. J.**, v. 299, p. 831–837, 1994.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)). **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-MIRANDA, J. et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain). **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 20, n. 4, p. 284-294, 2010.

LU, G.; MEIER, K. E.; JAFFA, A. A.; ROSENZWEIG, S. A.; EGAN, B. M. Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 31, n. 4, p. 978-985, 1998.

LU, G.; MORINELLI, T. A.; MEIER, K. E.; ROSENZWEIG, S. A.; EGAN, B. M. Oleic acid-induced mitogenicsignaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. **Circ. Res.**, v. 79, n. 3, p. 611-618, 1996.

LUO, D.; RENAULT, V. M.; RANDO, T. A. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 16, n. 5, p. 612-622, 2005.

LYNGE, J.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. **J. Physiol.**, v. 537, n. 2, p. 597-605, 2001.

MACHADO, R. V.; MAURICIO, A. F.; TANIGUTI, A. P.; FERRETTI, R.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Eicosapentaenoic acid decreases TNF- α and protects dystrophic muscles of mdx mice from degeneration. **J. Neuroimmunol.**, v. 232, n. 2, p. 145-150, 2011.

MACINTOSH, B. R.; HOLASH, R. J.; RENAUD, J. M. Skeletal muscle fatigue--regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. **J. Cell Sci.**, v. 1, n. 125, p. 2105-2114. 2012.

MANN, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet. Muscle**, v. 1, p. 21, 2011.

MARKWORTH, J. F.; CAMERON-SMITH, D. Arachidonic acid supplementation enhances in vitro skeletal muscle cell growth via a COX-2-dependent pathway. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 1, n. 1, p. 56-67, 2013.

MARSHALL, P. A.; WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. **Muscle Nerve**, v. 12, p. 528–537, 1989.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 9, p. 493-495, 1961.

MAZANET, R.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. The satellite cell. In: ENGEL, R. G.; BANKER, B. Q. (Ed.). **Myology**, n. 1, p. 285–307, 1986.

MCARDLE, A.; EDWARDS, R. H.; JACKSON, M. J. Release of creatine kinase and prostaglandin E2 from regenerating skeletal muscle fibers. **J. Appl. Physiol.**, v. 76, p. 1274–1278, 1994.

MCARDLE, A.; EDWARDS, R. H. T.; JACKSON, M. J. Effects of contractile activity on muscle damage in the dystrophin-deficient mdx mouse. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 80, p. 367–371, 1991.

MCKAY, B. R.; TOTH, K. G.; TARNOPOLSKY, M. A.; PARISE, G. Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. **J. Physiol.**, v. 588, p. 3307–3320, 2010.

MCKINNELL, I. W.; PARISE, G.; AND RUDNICKI, M. A. Muscle stem cells and regenerative myogenesis. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 71, p. 113–130, 2005.

MCLENNAN, I. S. Hormonal regulation of myoblast proliferation and myotube production in vivo: influence of prostaglandins. **J. Exp. Zool.**, v. 241, p. 237–245, 1987.

MENDIAS, C. L.; TATSUMI, R.; ALLEN, R. E. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in satellite cell proliferation, differentiation, and fusion. **Muscle Nerve**, v. 30, p. 497–500, 2004.

MENETREY, J. et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. **J. Bone Joint. Surg. Br.**, v. 82, p. 131–137, 2000.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD, J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. **Am. J. Sports Med**, v. 27, p. 222–229, 1999.

MEYER, G. A.; LIEBER, R. L. Elucidation of extracellular matrix mechanics from muscle fibers and fiber bundles. **J. Biomech.**, v. 44, p. 771–773, 2011.

MIKELS, A. J.; NUSSE, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene**, v. 4, n. 25, p. 7461–7468, 2006.

MINER, J. H.; WOLD, B. Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 1089–1093, 1990.

MORAN, J. L.; LI, Y.; HILL, A. A.; MOUNTS, W. M.; MILLER, C. P. Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. **Physiol Genomics**, v. 14, n. 10, p. 103–111, 2002.

MOSS, F. P. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during restricted growth, degrowth and compensatory growth of skeletal muscle. **Am. J. Anat.**, v. 122, n. 3, p. 565-571, 1968.

MOUSSA, M.; GOURANTON, E.; GLEIZE, B.; YAZIDI, C. E.; NIOT, I.; BESNARD, P.; BOREL, P.; LANDRIER, J. F. CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. **Nutr. Food Res.**, v. 55, n. 4, p. 578-584, 2011.

MOUSSA, M.; LE BOUCHER, J.; GARCIA, J.; TKACZUK, J.; RAGAB, J.; DUTOT, G.; OHAYON, E.; GHISOLFI, J.; THOUVENOT, J. P. In vivo effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. **Clin. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 49-54, 2000.

MURPHY, M. M.; LAWSON, J. A.; MATHEW, S. J.; HUTCHESON, D. A.; KARDON, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development**, v. 138, p. 3625–3637, 2011.

MUTSUMI, W.; YURIKO I.; TATSUO, S.; HAMAZAKI, H. O. Efficient Myogenic Differentiation of Murine Dermal Sca-1 (–) Cells via Initial Aggregation Culture. **Tissue engineering: Part A**, v. 16, n. 10, 2010.

NEGISHI, S.; LI, Y.; USAS, A.; FU, F. H.; HUARD, J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. **Am. J. Sports Med.**, v. 33, p. 1816–1824, 2005.

NGUYEN, M. H.; CHENG, M.; KOH, T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. **Scientific World Journal**, v. 28, n. 11, p. 1525-1537, 2011.

OLIVEIRA, F. Contração muscular. In: PITHON-CURI, T. **Fisiologia do exercício**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 56-71.

OTIS, J. S.; BURKHOLDER, T. J.; PAVLATH, G. K. Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway. **Exp. Cell Res.**, v. 310, p. 417–425, 2005.

OTT, M. O.; BOBER, E.; LYONS, G.; ARNOLD, H.; BUCKINGHAM, M. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. **Development**, v. 111, p. 1097–1107, 1991.

PALERMO, A. T.; LABARGE, M. A.; DOYONNAS, R.; POMERANTZ, J.; BLAU, H. M. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. **Dev. Biol.**, v. 15, n. 2, p. 336-344, 2005.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Prog. Lipid Res.**, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.

PARK, J. K.; KI, M. R.; LEE, E. M.; KIM, A. Y.; YOU, S. Y.; HAN, S. Y.; et al. Losartan improves adipose tissue-derived stem cell niche by inhibiting transforming growth

factor-beta and fibrosis in skeletal muscle injury. **Cell Transplant.**, v. 21, p. 2407–2424, 2012.

PARTRIDGE, T. A.; GROUNDS, M.; SLOPER, J. C. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. **Nature**, v. 273, p. 306–308, 1978.

PAULIN, D.; LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Exp. Cell Res.**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2004.

PEARCE, P. H.; KAKULAS, B. A. Skeletal muscle lipids in normal and dystrophic mice. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 58, n. 4, p. 397-408, 1980.

PEAULT, B.; RUDNICKI, M.; TORRENTE, Y.; COSSU, G.; TREMBLAY, J. P.; PARTRIDGE, T.; GUSSONI, E.; KUNKEL, L. M.; HUARD. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. **J. Mol. Ther.**, v. 15, p. 867-877, 2007.

PERDICONI, M. F.; POLITI, L. E.; BOUZAT, C. B.; DE LOS SANTOS E. B.; BARRANTES, F. J. Myogenic differentiation of the muscle clonal cell line BC3H-1 is accompanied by changes in its lipid composition. **Lipids**, v. 27, n. 9, p. 669-675, 1992.

PEREIRA, B. P.; TAN, B. L.; HAN, H. C.; ZOU, Y.; AUNG, K. Z.; LEONG, D. T. Intramuscular nerve damage in lacerated skeletal muscles may direct the inflammatory cytokine response during recovery. **J. Cell Biochem.**, v. 113, p. 2330–2345, 2012.

PERRY, R. L.; RUDNICK, M. A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 5, p. 750-767, 2000.

PIECADE, M. C.; GALHARDO, M. S.; BATTLEHNER, C. N.; FERREIRA, M. A.; CALDINI, E. G.; DE TOLEDO, O. M. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. **Ultrasonics**, v. 48, p. 403–411, 2008.

PINHEIRO, C. H. J. Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: Modulação por ácido oleico. Área de concentração: fisiologia humana. 2012. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PRIVES, J.; SHINITZKY, M. Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. **Nature**, n. 25, v. 268, p. 761-763, 1977.

RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science**, v. 307, p. 1904, 2005.

RAO, G. N.; ALEXANDER, R. W.; RUNGE, M. S. Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA

expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 842–847, 1995.

RELAIX, F.; ZAMMIT, P. S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. **Development**, v. 139, n. 16, p. 2845–2856, 2012.

RHODES, S. J.; KONIECZNY, S. F. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. **Genes Dev.**, v. 3, p. 2050–2061, 1989.

RISÉRUS, U.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. **Prog. Lipid Res.**, v. 48, n. 1, p. 44–51, 2009.

RODEMAN, H. P.; GOLDBERG, A. L. Arachidonic acid, PGE₂ and F₂ α influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 1632–1638, 1982.

RODEMAN, H. P.; WAXAMN, L.; GOLDBERG, A. L. The stimulation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ is mediated by prostaglandin E₂ and does not require the calcium-activated protease. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 8716–8723, 1982.

RODRIGUES, H. G. **Modulação pelo processo de cicatrização pelos ácidos oléico e linoleico**. 2011. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

RODRIGUES, H. G.; VINOLO, M. A.; MAGDALON, J.; FUJIWARA, H.; CAVALCANTI, D. M.; FARSKY, S. H.; CALDER, P. C.; HATANAKA, E.; CURI R. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. **Lipids**, v. 45, n. 9, p. 809–819, 2010.

RODRIGUES, H. G.; VINOLO, M. A.; MAGDALON, J.; VITZEL, K.; NACHBAR, R. T.; PESSOA, A. F.; DOS SANTOS, M. F.; HATANAKA, E.; CALDER, P. C.; CURI. R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. **J. Invest. Dermatol.**, v.132, n. 1, p. 208–215, 2012.

ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M.D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem.**, v. 6, n. 2, p. 318–320, 2010.

RONALD, E.; ALLEN; LYNDIA, S.; LUITEN; MICHAEL, V.; DODSON. **Effect of insulin and linoleic acid on satellite cell differentiation**. Therapeutic Research, 1985.

RUDNICKI, M. A.; BRAUN, T.; HINUMA, S.; JAENISCH, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. **Cell**, v. 71, p. 383–390, 1992.

RUDNICKI, M. A.; SCHNEGELSBERG, P. N.; STEAD, R. H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H. H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, p. 1351–1359, 1993.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. **Front. Aging Neurosci.**, v. 29, n. 6, p. 230, 2014.

SAMBASIVAN, R.; YAO, R.; KISSENPFENNIG, A.; VAN WITTENBERGHE, L.; PALDI, A.; GAYRAUD-MOREL, B.; GUENOU, H.; MALISSEN, B.; TAJBAKHS, S.; GALY, A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. **Development**, v. 138, p. 3647–3656, 2011.

SATO, K. et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v. 28, p. 365–372, 2003.

SAURO, V. S.; STRICKLAND, K. P. Changes in oleic acid oxidation and incorporation into lipids of differentiating L6 myoblasts cultured in normal or fatty acid-supplemented growth medium. **Biochem. J.**, v. 15, n. 3, p. 743-744, 1987.

SAVOLAINEN, J.; MYLLYLÄ, V.; MYLLYLÄ, R.; VIHKO, V.; VAANANEN, K.; TAKALA, T. E. Effects of denervation and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 254, p. 897–902, 1988.

SCHOENFELD, B. J. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. **J. Strength Cond. Res.**, v. 24, n. 10, p. 2857-2872, 2010.

SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D. L.; GIBSON, M. C.; ALBRIGHT, D. J. Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 7, p. 361–367, 1986.

SCHULTZ, E.; GIBSON, M. C.; CHAMPION, T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. **J. Exp. Zool.**, v. 206, p. 451–456, 1978.

SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D. L.; VALLIERE, C. R. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. **Muscle Nerve**, v. 8, p. 217–222, 1985.

SERRANO, A. L.; BAEZA-RAJA, B.; PERDIGUERO, E.; JARDÍ, M.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. **Cell Metab.**, v. 7, n. 1, p. 33-44, 2008.

SHAFIQ, S. A.; GORYCKI, M. A. Regeneration in skeletal muscle of mouse: some electron-microscope observations. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 90, p. 123–127, 1965.

SHEFER, G.; WLEKLINSKI-LEE, M.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 5393, 2004.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D. P.; RICHARDSON, J. B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev. Biol.**, v. 294, p. 50–66, 2006.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. **Am. J. Pathol.**, v. 167, p. 1105–1117, 2005.

SHEN, W.; PRISK, V.; LI, Y.; FOSTER, W.; HUARD, J. Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2 α . **J. Appl. Physiol.**, v. 101, p. 1215–1221, 2006.

SHEN, Y.; WEI, H.; JIN, C. L. Effects of Chinese herbal medicine XuefuZhuyu Decoction on angiotensin II-induced proliferation and extracellular matrix synthesis of rat cardiac fibroblasts. **Zhong Xi Yi Jie He XueBao**, v. 3, n. 9, p. 313-319, 2011.

SHERWOOD, R. I.; CHRISTENSEN, J. L.; CONBOY, I. M.; CONBOY, M. J.; RANDO, T. A.; WEISSMAN, I. L.; WAGERS, A. J. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. **Cell**, v. 119, n. 4, p. 543-554, 2004.

SHI, D.; REINECKE, H.; MURRY, C. E.; TOROK-STORB. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. **B. Blood**, v. 104, p. 290, 2004.

SIMOPOULOS, A. P. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 1, p. 131-134, 2008.

SMITH, R. H.; PALMER, R. M.; REEDS, P. J. Protein synthesis in isolated rabbit forelimb muscles. The possible role of metabolites of arachidonic acid in the response to intermittent stretching. **Biochem. J.**, v. 214, p. 153–161, 1983.

SNOW, M. H. A quantitative ultrastructure analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. **Anat. Rec.**, v. 207, p. 593–604, 1983.

STARK, K. D.; LIM, S. Y.; SALEM, N. Docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid supplementation alter rat skeletal muscle fatty acid composition. **Lipids Health Dis.**, v. 6, p. 11, 2007.

STORLIEN, L. H.; JAMES, D. E.; BURLEIGH, K. M.; CHISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 251, n. 5, p. 576-583, 1986.

STRATOS, I.; ROTTER, R.; EIPEL, C.; MITTLMEIER, T.; VOLLMAR, B. Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 5, p. 1857-1863, 2007.

SUGITA, M.; SUGITA, H.; KIM, M.; MAO, J.; YASUDA, Y.; HABIRO, M.; SHINOZAKI, S.; YASUHARA, S.; SHIMIZU, N.; MARTYN, J.; KANEKI, M. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but

does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. **Metabolism**, v. 61, n. 1, p. 127-136, 2012.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch.Pathol.**, v. 78, p. 69–72, 1964.

TAMILARASAN, K. P.; TEMMEL, H.; DAS, S. K.; AL ZOUGHBI, W.; SCHAUER, S.; VESELY, P. W.; HOEFER, G. Skeletal muscle damage and impaired regeneration due to LPL-mediated lipotoxicity. **Cell Death Dis.**, v. 19, n. 3, p. 354, 2012.

TAYLOR, D. C.; DALTON, J. D.; SEABER, A. V.; GARRETT, W. E. Experimental muscle strain injury: early functional and structural deficits, and the increased risk for reinjury. **Am. J. Sports Med.**, v. 21, p. 190–194, 1993.

TEN BROEK, R. W.; GREFFE, S.; VON DEN HOFF, J. W. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. **J. Cell Physiol.**, v. 224, n. 1, p. 7-16, 2010.

THEISE, N. D. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. Gastrointestinal stem cells. III. Emergent themes of liver stem cell biology: niche, quiescence, self-renewal, and plasticity. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, n. 2, p. 189-193, 2006.

TUAZON, M. A.; HENDERSON, G. C. Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipid is altered in mdx mice and is predictive of disease markers. **Metabolism**, v. 61, n. 6, p. 801-811, 2012.

TURNER, N. D.; BADYLAK, J. S.; WEBER, D. J.; BADYLAK, S. F. Biologic Scaffold remodeling in a dog model of complex musculoskeletal injury. **J. Surg. Res.**, v. 176, p. 490–502, 2012.

UNITED STATES THE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. A **National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20**. British Nutrition Foundation Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance. London: Chapman and Hall, 1992.

VAITTINEN, S.; HURME, T.; RANTANEN, J.; KALIMO, H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. **Neuromuscul. Disord.**, v. 12, p. 584–587, 2002.

VAN DER BOSCH, J.; SCHUDDT, C.; PETTE, D. Influence of temperature, cholesterol, dipalmitoyllecithin and Ca²⁺ on the rate of muscle cell fusion. **Exp. Cell Res.**, v. 82, n. 2, p. 433-438, 1973.

VAN, E. J. H.; VAN, GIJN.; RICCIO, M. E.; VANDEN BORN, O.; VOOIJS, M.; BEGTHEL, M.; COZIJNSEN, H.; ROBINE, M.; WINTON, S.; RADTKE, D. J. F. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature**, v. 435, p. 959, 2005.

VELIÇA, P. P.; KHANIM, F. L.; BUNCE, C. M. Prostaglandin D2 inhibits C2C12 myogenesis. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 319, p. 71–78, 2010.

VERTINO, A. M.; TAYLOR-JONES, J. M.; LONGO, K. A.; BEARDEN, E. D.; LANE, T. F.; MCGEHEE, R. E.; JR, MAC DOUGALD, O. A.; PETERSON, C.A. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. **Mol. Biol. Cell.** v. 16, n. 4, p. 2039-2048, 2005.

WADA, M. R.; INAGAWA-OGASHIWA, M.; SHIMIZU, S.; YASUMOTO, S.; HASHIMOTO, N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. **Development**, v. 129, p. 2987, 2002.

WALDEYER, W. **Arch. Path Anat. Physiol.** v. 34, p. 473–514, 1865.

WANG, J.; LIU, Y.; ZHANG, L.; JI, J.; WANG, B.; JIN, W.; ZHANG, C.; CHU, H. Effects of increased matrix metalloproteinase-9 expression on skeletal muscle fibrosis in prolonged alcoholic myopathies of rats. **Mol. Med. Rep.**, n. 5, p. 60-65, 2012.

WANG, W.; PAN, H.; MURRAY, K.; JEFFERSON, B.S.; LI, Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. **Am. J. Pathol.**, v. 174, p. 541–549, 2009.

WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells, the engines of muscle repair. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 13, p. 127-133, 2011.

WARREN, G. L.; SUMMAN, X.; GAO, R.; CHAPMAN, T.; HULDERMAN, P. P.; SIMEONOVA. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. **J. Physiol.**, v. 582, p. 825–841, 2007.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G.; Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. **J. Gen. Physiol.**, v. 98, n. 3, p. 615-35. 1991.

WESTERBLAD, H.; LEE, J. A.; LÄNNERGREN, J.; ALLEN, D. G. Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 261, n. 2, p. 195-209. 1991.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Rev. Immunol.**, v. 6, p. 93, 2006.

WINICK, M.; NOBLE, A. Quantitative changes in ribonucleic acids and protein during normal growth of rat placenta. **Nature**, v.1; n. 212, p. 34-35, 1966.

WOOLCOTT, O. O.; GUSTAFSSON, A. J.; DZABIC, M.; PIERRO, C.; TEDESCHI, P.; SANDGREN, J.; BARI, M. R.; NGUYEN, K. H.; BIANCHI, M.; RAKONJAC, M.; RÅDMARK, O.; OSTENSON, C. G. R.; ISLAM, M. S. Arachidonic acid is a physiological activator of the ryanodine receptor in pancreatic beta-cells. **Cell Calcium**, v. 39, p. 529–537, 2006.

WRIGHT, W. E.; SASSOON, D. A.; LIN, V. K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. **Cell**, v. 56, p. 607-617, 1989.

YOUNG, E. W., SPARKS, H. V. Prostaglandin E release from dog skeletal muscles during restricted flow exercise. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 236, p. 596–599, 1979.

ZAMMIT, P. S.; GOLDING, J. P.; NAGATA, Y.; HUDON, V.; PAR-TRIDGE, T. A.; BEAUCHAMP, J. R. J. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? **Cell Biol.**, v. 166, p. 347, 2004.

ZHANG, G.; CHEN, X.; LIN, L.; WEN, C.; RAO, S. Effects of fatty acids on proliferation and differentiation of myoblast. **Wei Sheng Yan Jiu**, n. 41, v. 6, p. 883–888, 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; AND HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.**, v. 7, n. 2, p. 211–28, 2001.

APÊNDICE –

Dados individuais

Quadro A1: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de ácidos graxos do músculo gastrocnêmio (g/100g de tecido), protocolo experimental A, apresentados na Figura 11A.

	Om		Lin		Ole	
Nome	C	L	C	L	C	L
Saturada	29,610	27,290	34,513	30,173	33,665	31,748
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,901	0,954	1,694	1,415	0,853	1,560
Monoinsaturada	14,553	22,105	11,028	17,353	15,045	18,160
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,794	1,459	1,087	2,185	2,313	2,335
Polinsaturada (n-3)	8,430	4,568	7,140	7,358	8,128	6,098
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,983	0,216	0,682	1,360	1,133	1,482
Polinsaturada (n-6)	46,525	45,430	44,030	43,605	42,123	43,998
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	3,371	0,572	1,392	1,271	0,414	0,909

Quadro A2: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a razão entre ácidos graxos n-6/n-3 do músculo gastrocnêmio (g/100g de tecido), protocolo experimental A, apresentados na Figura 11B.

	Om		Lin		Ole	
Nome	C	L	C	L	C	L
Razão n-6 / n-3	6,793	10,003	6,400	6,513	5,500	8,748
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,860	0,382	0,842	1,130	0,761	2,194

Quadro A3: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a razão entre ácidos graxos oleico/esteárico do músculo gastrocnêmio (g/100g de tecido), protocolo experimental A, apresentados na Figura 11C.

	Om		Lin		Ole	
Nome	C	L	C	L	C	L
Razão oleico/esteárico	1,068	2,655	0,580	1,303	0,890	1,403
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,239	0,466	0,067	0,272	0,222	0,365

Quadro A4: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao peso úmido do músculo gastrocnêmio (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 12A**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
2,113	1,921	1,891	1,621	2,068	1,961
2,062	1,928	1,906	1,729	2,029	1,655
2,151	1,956	2,172	1,948	2,226	1,959
2,304	2,122	1,867	1,658	2,043	1,813
2,129	1,919	2,027	1,574	1,885	1,696
2,042	1,997	2,010	1,656	2,017	1,932
2,065	1,996	1,786	1,615	2,375	2,048
2,124	1,977	1,951	1,686	2,092	1,866
$\pm 0,034$	$\pm 0,027$	$\pm 0,048$	$\pm 0,047$	$\pm 0,060$	$\pm 0,056$

Quadro A5: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao peso úmido do músculo sóleo (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 12B**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,135	0,132	0,131	0,142	0,129	0,138
0,123	0,127	0,119	0,116	0,146	0,082
0,138	0,140	0,149	0,103	0,134	0,141
0,140	0,151	0,108	0,117	0,131	0,170
0,122	0,125	0,122	0,125	0,115	0,114
0,127	0,155	0,122	0,128	0,127	0,124
0,150	0,151	0,112	0,077	0,142	0,149
0,133	0,140	0,123	0,115	0,132	0,131
$\pm 0,004$	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,008$	$\pm 0,004$	$\pm 0,011$

Quadro A6: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao peso úmido do músculo EDL (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 12C**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,153	0,160	0,138	0,144	0,162	0,161
0,135	0,138	0,138	0,136	0,139	0,143
0,135	0,149	0,147	0,151	0,160	0,164
0,098	0,135	0,133	0,136	0,151	0,159
0,095	0,143	0,143	0,139	0,131	0,120
0,123	0,144	0,140	0,139	0,155	0,142
0,147	0,165	0,130	0,127	0,176	0,189
0,127	0,148	0,138	0,139	0,154	0,154
$\pm 0,009$	$\pm 0,004$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,006$	$\pm 0,008$

Quadro A7: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a massa de gordura retroperitoneal (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 13A**.

Om	Lin	Ole
4,571	2,935	1,004
2,035	0,881	1,478
3,031	2,858	2,610

1,649	3,106	2,434
2,578	2,090	4,211
4,394	2,567	2,780
3,131	1,372	3,216
3,056	2,258	2,533
± 0,418	± 0,321	± 0,402

Quadro A8: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a massa de gordura subcutânea (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 13B**.

Om	Lin	Ole
8,217	2,875	2,594
2,868	3,054	2,696
3,670	3,497	3,705
3,395	4,920	3,820
4,797	2,897	4,705
2,247	3,992	5,650
1,690	2,249	5,387
3,841	3,355	4,080
± 0,822	± 0,332	± 0,460

Quadro A9: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a massa de gordura epididimal (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 13C**.

Om	Lin	Ole
5,379	2,856	2,091
2,657	2,448	2,654
3,606	3,498	3,623
3,459	3,915	3,927
3,988	2,339	3,920
5,713	3,322	3,705
5,188	2,317	3,958
4,284	2,956	3,411
± 0,434	± 0,239	± 0,279

Quadro A10: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a massa de gordura mesentérica (g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 13D**.

Om	Lin	Ole
2,000	2,192	1,537
1,920	1,645	1,867
2,633	2,413	2,403
2,560	2,670	2,720
3,407	2,299	3,219
1,740	2,367	1,798
2,769	1,613	3,504
2,433	2,171	2,435
± 0,220	± 0,150	± 0,283

Quadro A11: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a força isotônica absoluta do músculo gastrocnêmio (mN), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 14A**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
3964,98	3037,99	3580,00	3777,50	4209,69	2416,88
3206,85	2660,40	2957,93	3211,85	3223,02	2733,61
2913,83	2991,44	3321,00	3296,42	2859,93	3158,05
3139,92	3593,56	3198,42	2992,33	4374,92	2592,59
3024,28	2069,37	2562,90	222,25	3138,45	2591,12
3107,97	1441,58	3565,24	1196,39	2840,92	2404,92
3746,74	3079,90	2627,87	1874,34	2689,03	3053,97
2910,11	2213,23	2020,96	1553,10	3512,81	2274,48
		2970,97	1700,59	2707,65	1421,10
3252	2636	2978	2203	3284	2516
$\pm 138,3$	$\pm 243,8$	$\pm 170,2$	$\pm 391,5$	$\pm 210,4$	$\pm 168,3$

Quadro A12: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a força isotônica específica do músculo gastrocnêmio (mN/g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 14B**. Os valores foram calculados com base no peso seco (g) do músculo gastrocnêmio.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
5793,64	4393,562	4891,023	435,776	6340,303	4807,273
6785,965	3147,555	5992	2163,458	5231,9	4697,109
6837,109	5800,196	4769,274	3464,584	4915,96	5918,554
6613,886	5546,947	3820,333	3189,125	6807,771	4390,892
		5451,317	3341,049	5207,019	2819,639
6507,65	4722,07	4984,79	3039,55	5700,59	4526,69
$\pm 242,74$	$\pm 607,58$	$\pm 363,54$	$\pm 297,41$	$\pm 368,37$	$\pm 498,87$

Quadro A13: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a força tetânica absoluta do músculo gastrocnêmio (mN) **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 14C**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
10142,97	5346,33	10590,46	10505,31	9505,31	10672,31
11242,97	8893,88	9188,17	11553,44	9951,29	11814,10
9513,15	9782,54	10398,08	9666,45	9766,59	9513,15
10142,97	10628,88	10130,15	11806,80	10706,79	10451,90
11242,97	8068,73	9780,01	11483,05	11483,05	11242,97
10445,90	8803,56	10716,59	9468,57	9468,57	11451,90
11646,83	7490,50	9717,88	9501,38	9600,38	11646,83
10842,98	7952,79	7172,23	11694,81	10692,88	10142,97
		9872,43	9963,23	9751,23	9850,65
10691	8371	9730	10414	10125	10765
$\pm 280,0$	$\pm 562,9$	$\pm 357,1$	$\pm 258,3$	$\pm 229,3$	$\pm 271,3$

Quadro A14: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à força tetânica específica do músculo gastrocnêmio (mN/g), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 14D**. Os valores foram calculados com base no peso seco (g) do músculo gastrocnêmio.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
21538,25	17131,07	18664,14	22515,79	23198,08	20858,94
25004,14	19221,75	18011,07	17122,19	17437,52	22366,98
21253,33	14106,4	17636,8	17745,62	17550,97	22571,37
23052,2	19931,7	13558,09	21956,63	20722,63	19581,02
		18114,55	19550,57	19137	19744,52
22711,98	17597,73	17196,93	19778,16	19609,24	21024,57
± 859,99	± 1306,78	± 924,45	± 1083,46	± 1079,24	± 630,26

Quadro A15: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao peso seco do músculo gastrocnêmio (g) **protocolo experimental A**, citados na **Figura 14**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,522	0,471	0,524	0,51	0,495	0,539
0,458	0,458	0,595	0,553	0,543	0,512
0,548	0,531	0,551	0,541	0,547	0,516
0,44	0,399	0,529	0,487	0,516	0,518
		0,545	0,509	0,52	0,504
0,492	0,465	0,549	0,520	0,524	0,518
± 0,026	± 0,027	± 0,013	± 0,012	± 0,010	± 0,006

Quadro A16: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao tempo de contração (TTP) do músculo gastrocnêmio (ms), **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 15A**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
40	30	30	40	30	30
30	50	30	30	30	40
40	40	40	40	30	30
30	30	30	30	30	30
40	40	40	40	40	40
40	40	30	20	30	40
40	30	30	50	30	40
30	30	40	50	40	40
		40	50	30	40
36,25	36,25	34,44	38,89	32,22	36,67
± 1,830	± 2,631	± 1,757	± 3,514	± 1,470	± 1,667

Quadro A17: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao tempo relaxamento (HRT) do músculo gastrocnêmio, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 15B**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
35,43	23,42	13,50	21,50	16,97	35,59
32,77	30,11	20,10	19,24	26,68	24,11
30,81	27,94	26,90	21,64	18,81	35,02
19,09	25,92	19,21	36,61	24,57	30,26
24,37	31,77	25,75	26,00	21,19	26,67
24,77	28,48	31,11	29,86	30,46	23,83
24,67	25,10	41,70	28,96	25,68	35,31
25,25	26,49	34,78	37,00	24,09	18,27
		63,57	37,09	27,81	19,30

27,15	27,40	26,63	28,66	24,03	27,60
± 1,898	± 0,964	± 3,231	± 2,362	± 1,447	± 2,263

Quadro A18: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a resistência à fadiga (decaimento em percentagem da força inicial) no músculo gastrocnêmio, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 16A** e **Figura 16B**.

Óleo mineral pata contralateral

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média	± EPM
1	100	100	100	100	100,00	± 0,000
2	85,48	90,72	90	97,71	90,98	± 2,526
3	75,66	88,48	71,61	95,69	82,86	± 5,587
4	76,19	86,00	70,92	95,30	82,10	± 5,396
5	79,48	84,89	69,79	94,09	82,06	± 5,082
6	72,25	83,34	69,6	92,12	79,33	± 5,200
7	75,17	83,07	69,74	90,83	79,70	± 4,609
8	78,71	82,78	69,32	90,51	80,33	± 4,411
9	74,15	82,80	69,01	89,54	78,88	± 4,553
10	73,24	82,50	68,91	88,77	78,36	± 4,482

Óleo mineral pata lesionada

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média	± EPM
1	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	± 0,000
2	85,46	94,09	95,94	94,74	92,56	± 2,397
3	63,01	92,62	94,39	83,50	83,38	± 7,197
4	63,08	80,54	88,73	82,26	78,65	± 5,482
5	52,56	78,70	72,65	82,27	71,55	± 6,632
6	56,17	74,56	58,06	82,13	67,73	± 6,332
7	51,43	71,17	56,20	65,81	61,15	± 4,482
8	39,59	66,10	41,91	65,17	53,19	± 7,202
9	54,05	55,37	40,25	51,64	50,33	± 3,447
10	49,89	46,50	38,76	50,33	46,37	± 2,677

Linoleico pata contralateral

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Média	± EPM
1	100	100	100	100	100	100,00	± 0,000
2	88,41	94,88	84,94	82,74	86,5	87,49	± 2,068
3	82,52	93,26	83,18	80,63	86,09	85,14	± 2,212
4	82,46	90,41	81,9	77,7	82,35	82,96	± 2,061
5	72,65	87,05	52,56	72,59	78,7	72,71	± 5,690
6	58,06	86,57	56,17	68,71	74,56	68,81	± 5,585
7	56,20	84,11	51,43	65,94	71,17	65,77	± 5,757
8	41,91	80,86	39,59	65,46	66,1	58,78	± 7,870
9	40,25	76,82	54,05	61,04	55,37	57,51	± 5,915
10	38,76	75,21	49,89	57,11	46,5	53,49	± 6,179

Linoleico pata lesionada

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Média	± EPM
1	100	100	100	100	100	100,00	± 0,000
2	97,69	87,71	95,48	93,65	84,01	91,71	± 2,540
3	94,32	85,17	90,34	87,55	78,99	87,27	± 2,571

4	91,23	82,30	89,56	85,94	78,93	85,59	± 2,268
5	78,70	52,56	82,27	52,56	72,65	67,75	± 6,388
6	74,56	56,17	82,13	56,17	58,06	65,42	± 5,422
7	71,17	51,43	65,81	51,43	56,20	59,21	± 3,979
8	66,10	39,59	65,17	39,59	41,91	50,47	± 6,206
9	55,37	54,05	51,64	54,05	40,25	51,07	± 2,772
10	38,76	75,21	49,89	57,11	46,50	53,49	± 6,179

Oleico pata contralateral

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Média	± EPM
1	100	100	100	100	100	100,00	± 0,000
2	84,01	96,82	92,22	92,91	85,82	90,36	± 2,373
3	78,99	94,99	90,45	82,14	85,41	86,40	± 2,866
4	78,93	91,76	86,02	81,11	81,69	83,90	± 2,276
5	77,98	82,27	81,14	79,55	80,65	80,32	± 0,729
6	75,83	82,13	80,66	76,95	80,47	79,21	± 1,199
7	75,54	65,81	79,62	76,03	79,78	75,36	± 2,543
8	74,18	65,17	78,15	71,96	79,52	73,80	± 2,546
9	72,17	51,64	76,20	69,00	80,28	69,86	± 4,934
10	73,33	50,33	75,08	67,30	79,48	69,10	± 5,084

Oleico pata lesionada

Contrações	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Média	± EPM
1	100	100	100	100	100	100,00	± 0,000
2	92,66	86,77	74,27	89,69	68,33	82,34	± 4,69
3	92,42	72,41	81,13	86,09	67,78	79,97	± 4,470
4	91,18	71,70	77,70	82,51	67,23	78,06	± 4,182
5	77,98	59,36	81,14	82,27	58,67	71,88	± 5,302
6	75,83	58,60	80,66	82,13	54,53	70,35	± 5,759
7	75,54	55,50	79,62	65,81	53,53	66,00	± 5,207
8	74,18	53,42	78,15	65,17	51,61	64,51	± 5,336
9	72,17	51,03	76,20	51,64	49,18	60,04	± 5,822
10	73,33	48,56	75,08	50,33	46,89	58,84	± 6,303

Quadro A19: Médias ± EPM referentes à área de secção transversa do músculo (μm^2) gastrocnêmio, **protocolo experimental A**, apresentadas nas **Figuras 17A** e **Figuras 17B**.

Patas

Grupos	Contralateral	Lesionada
Óleo Mineral	4912 ± 55,59	4778 ± 90,07
Linoleico	3950 ± 56,54	3585 ± 52,61
Oleico	4558 ± 65,16	4661 ± 65,26

Quadro A20: Médias ± EPM referentes à área tecido fibroso do músculo (μm^2) gastrocnêmio, **protocolo experimental A**, apresentadas nas **Figuras 19A**.

Patas

Grupos	Contralateral	Lesionada
Óleo Mineral	27,826 ± 2,53	44,866 ± 4,87
Linoleico	31,651 ± 2,57	68,637 ± 5,42
Oleico	38,293 ± 4,61	33,874 ± 4,52

Quadro A21: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *desmina* (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 21B**.

Desmina

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
1,079	0,474	0,574	0,904	1,213	0,952
1,390	1,104	1,295	1,112	0,949	1,117
1,310	1,168	1,282	0,995	0,851	1,072
0,867	1,145	0,943	0,734	1,854	2,689
0,790	1,279	0,951	0,957	2,299	2,029
1,087	1,034	1,009	0,940	1,433	1,572
± 0,118	± 0,143	± 0,133	± 0,062	± 0,237	± 0,339

Quadro A22: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *vimentina* (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 21C**.

Vimentina

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,336	0,652	0,621	1,310	1,063	1,155
0,406	0,601	1,090	1,287	0,951	1,083
0,308	0,382	0,987	1,015	0,852	1,209
0,297	0,716	0,923	0,834	0,858	0,836
0,199	0,529	1,295	0,809	3,025	3,176
		2,150	2,223	2,418	2,448
0,309	0,576	1,178	1,246	1,528	1,651
± 0,033	± 0,057	± 0,214	± 0,214	± 0,387	± 0,383

Quadro A23: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *p-NF-kappaB* (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 22B**.

p-NF-kappaB

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,837	0,815	0,772	0,590	0,783	0,717
0,465	0,550	0,425	0,391	0,599	0,506
0,686	1,005	0,988	0,783	0,884	0,854
0,785	0,851	0,858	0,618	0,596	0,564
0,494	0,658	1,044	1,002	0,840	1,450*
0,468	1,038	0,497	0,347	0,255	0,628
0,588	0,835	0,815	0,739	0,653	0,680
± 0,068	± 0,068	± 0,102	± 0,144	± 0,080	± 0,057

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A24: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **NF-kappaB** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 22C**.

NF-kappaB

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,789	0,835	0,955	0,772	0,843	0,779
0,642	0,703	0,599	0,511	0,608	0,351
0,825	0,925	0,955	0,764	0,803	0,870
0,868	0,812	0,929	0,434	0,510	0,651
0,504	0,774	0,917	0,826	0,878	1,270
0,232	0,880	0,500	0,584	0,202	0,392
0,590	0,837	0,849	0,746	0,629	0,703
$\pm 0,099$	$\pm 0,031$	$\pm 0,081$	$\pm 0,112$	$\pm 0,090$	$\pm 0,118$

Quadro A25: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo da razão **p-NF-kappaB/NF-kappaB total** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 22D**.

p-NF-kappaB/NF-kappaB

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
1,061	0,976	0,808	0,764	0,928	0,920
0,725	0,783	0,710	0,765	0,986	1,442
0,831	1,086	1,035	1,024	1,101	0,981
0,904	1,049	0,923	1,425	1,168	0,866
0,979	0,851	1,138	1,213	0,956	1,141
2,019	1,179	0,994	0,594	1,262	1,601
1,134	0,988	0,948	0,981	1,072	1,184
$\pm 0,169$	$\pm 0,051$	$\pm 0,055$	$\pm 0,109$	$\pm 0,045$	$\pm 0,106$

Quadro A26: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **P-44-42 MAPK** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 23B**.

P-44-42 MAPK

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,939	2,359	1,343	1,319	1,581	0,848
0,883	1,584	1,289	1,106	2,048	1,052
0,783	1,329	1,087	1,291	1,176	1,038
0,940	1,687	1,762	1,403	0,992	1,217
1,647	1,486	1,871	1,916	1,638	2,085
1,500	0,873	1,174	1,318	1,511	2,153
1,442	1,838	1,936	2,377	2,178	2,279
1,162	1,594	1,494	1,533	1,589	1,525
$\pm 0,134$	$\pm 0,173$	$\pm 0,133$	$\pm 0,169$	$\pm 0,161$	$\pm 0,234$

Quadro A27: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **44-42 MAPK total** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 23C**.

44-42 MAPK

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,581	1,197	1,030	1,224	1,201	1,321
1,335	1,512	1,695	1,293	0,970	1,994
1,156	1,598	1,639	2,072	1,141	1,546
1,585	1,706	1,512	1,853	1,623	1,401
0,934	0,894	1,206	1,111	1,162	1,132
0,831	1,206	1,260	1,198	0,751	0,964
1,757	2,324	2,290	2,433	1,472	1,871
1,168	1,491	1,519	1,598	1,189	1,461
$\pm 0,159$	$\pm 0,174$	$\pm 0,157$	$\pm 0,196$	$\pm 0,110$	$\pm 0,141$

Quadro A28: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo da razão **P-44-42 MAPK /44-42 MAPK total** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 23D**.

P-44-42 MAPK/44-42 MAPK

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
1,618	1,971	1,304	1,078	1,317	0,642
0,662	1,047	0,760	0,855	2,110	0,527
0,677	0,832	0,663	0,623	1,031	0,671
0,593	0,989	1,165	0,757	0,611	0,869
1,764	1,663	1,551	1,725	1,410	1,842
1,805	0,724	0,932	1,099	2,011	2,233
0,821	0,791	0,845	0,977	1,480	1,218
1,134	1,145	1,032	1,016	1,424	1,143
$\pm 0,212$	$\pm 0,181$	$\pm 0,121$	$\pm 0,134$	$\pm 0,197$	$\pm 0,249$

Quadro A29: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **p-S6** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 24B**.

p-S6

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,895*	0,814	0,378	0,269	0,080	0,465
0,215	0,578	0,373	0,373	0,053	0,687
0,054	0,532	0,839	0,812	0,537	0,529
0,168	0,309	0,254	0,045	0,209	0,651
0,410	0,062	0,685	0,843	0,729	0,098*
0,016	0,029	0,625	0,126	0,701	0,462
0,071	0,017	1,049	0,188	0,751	0,565
0,155	0,334	0,600	0,379	0,437	0,559
$\pm 0,059$	$\pm 0,119$	$\pm 0,107$	$\pm 0,122$	$\pm 0,118$	$\pm 0,038$

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A30: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **S6 total** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 24C**.

S6 total

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,877	0,392	0,450	0,394	0,244	0,256
0,099	0,119	0,396	0,353	0,357	0,449
0,539	0,334	0,445	0,423	0,709	0,935
0,846	0,510	0,615	0,356	0,513	0,820
0,811	1,182	0,777	0,166	0,443	0,340
0,259	0,522	0,400	0,596	0,699	0,759
0,787	0,779	1,002	0,220	0,671	0,289
0,602	0,548	0,583	0,358	0,519	0,549
$\pm 0,118$	$\pm 0,130$	$\pm 0,087$	$\pm 0,053$	$\pm 0,068$	$\pm 0,106$

Quadro A31: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo da razão **p-S6/S6 total** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 24D**.

p-S6/S6 total

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
1,020	2,077	0,841	0,683	0,328	1,820
2,164*	4,857*	0,942	1,057	0,149	1,530
0,101	1,591	1,886	1,920	0,757	0,566
0,198	0,606	0,413	0,125	0,408	0,795
0,506	0,052	0,882	5,067*	1,645	0,287
0,062	0,056	1,562	0,211	1,003	0,609
0,090	0,022	1,048	0,855	1,120	1,958
0,329	0,734	1,082	0,808	0,772	1,081
$\pm 0,153$	$\pm 0,364$	$\pm 0,185$	$\pm 0,267$	$\pm 0,198$	$\pm 0,254$

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A32: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **MuRF1** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 25B**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,948	0,950	1,059	1,121	0,874	1,124
1,046	0,852	1,141	1,027	0,846	1,107
0,803	0,842	1,030	0,935	0,965	1,000
1,035	1,079	0,786	0,419	0,733	0,531
0,285	0,097	0,985	1,368	0,593	0,437
0,226	0,494	0,829	0,502	0,460	0,375
0,576	0,815	0,962	0,703	0,829	0,429
0,703	0,733	0,970	0,868	0,757	0,715
$\pm 0,131$	$\pm 0,126$	$\pm 0,048$	$\pm 0,130$	$\pm 0,067$	$\pm 0,130$

Quadro A33: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **Atrogina-1** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 25C**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
1,006	1,131	1,024	0,950	0,868	1,028
1,159	1,025	0,879	0,781	1,302	0,871
0,760	0,617	1,009	0,693	0,918	0,899
1,063	0,357	0,731	0,354	0,554	0,803
0,386	0,586	1,176	0,904	1,020	0,672
0,064	0,486	0,500	0,508	0,886	0,764
0,750	0,854	0,999	0,464	0,791	0,345
0,741	0,722	0,903	0,665	0,906	0,769
$\pm 0,149$	$\pm 0,109$	$\pm 0,085$	$\pm 0,087$	$\pm 0,086$	$\pm 0,082$

Quadro A34: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **Pax 7** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 26B**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,028*	0,228	0,058*	0,165	0,070*	0,150
0,379	0,456	0,514	0,295	0,731	0,332
0,405	0,325	0,347	0,396	0,567	0,277
0,358	0,191	0,883	0,823	0,700	0,381
		1,670	1,131	0,785	0,718
		2,819	1,845		
0,380	0,300	1,247	0,775	0,695	0,371
$\pm 0,013$	$\pm 0,059$	$\pm 0,454$	$\pm 0,259$	$\pm 0,046$	$\pm 0,094$

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A35: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **Alfa actina** (unidades arbitrárias) normalizados pelo Ponceau, **protocolo experimental A**, apresentados na **Figura 26C**.

Om C	Om L	Lin C	Lin L	Ole C	Ole L
0,792	0,893	0,926	0,164	0,830	0,923
1,100	0,957	0,985	0,382	0,950	0,405
0,587	0,380	0,546	0,265	0,487	0,913
0,885	0,495	0,391	0,418	0,184	0,612
0,246	0,318	0,667	0,341	0,274	0,449
0,566	0,791	0,930	1,097*	0,542	0,451
0,163	0,344				0,151
0,619	0,596	0,740	0,314	0,544	0,557
$\pm 0,127$	$\pm 0,104$	$\pm 0,099$	$\pm 0,045$	$\pm 0,122$	$\pm 0,106$

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A36: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de **mRNA de MyoD** (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B1**, apresentados na **Figura 27A**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,23	1,01	1,19
1,30	1,35	1,90
0,89	1,35	1,61
0,71	1,00	1,54
	1,65	2,57
	2,13	3,34
1,033	1,415	2,025
± 0,139	± 0,174	± 0,323

Quadro A37: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Miogenina* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B1**, apresentados na **Figura 27B**.

Controle	Linoleico	Oleico
0,82	0,28	0,44
0,52	0,28	0,43
0,63	0,29	0,58
	0,35	0,32
2,11	0,49	1,13
1,76	1,65	1,04
1,168	0,5567	0,656
± 0,321	± 0,221	± 0,140

Quadro A38: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Myf6* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B1**, apresentados na **Figura 27C**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,27	0,93	0,79
0,59	0,95	1,04
0,83	1,21	0,86
	1,11	0,65
1,27	1,36	0,87
1,25	1,78	0,83
1,042	1,223	0,840
± 0,140	± 0,129	± 0,051

Quadro A39: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Desmina* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B2**, apresentados na **Figura 28A**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,15	0,71	4,22
1,53	1,87	2,30
0,55	0,91	4,88
	2,99	2,57
1,30	5,14*	2,94
0,78	1,22	
1,22	1,55	0,58
1,59	1,95	2,18

0,27	0,54	
1,049	1,468	2,810
± 0,166	± 0,284	± 0,534

*Considerado *outlier* conforme *Grubbs' test* -GraphPd Software

Quadro A40: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Vimentina* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B2**, apresentados na **Figura 28B**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,02	0,95	1,13
1,20	0,88	1,09
0,84	1,04	1,29
1,16	1,15	1,25
0,90	1,07	1,14
1,00	1,49	
0,83	1,09	0,91
1,18	1,00	1,36
0,95	1,46	1,05
1,009	1,126	1,153
± 0,047	± 0,071	± 0,050

Quadro A41: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de TRIM32* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de 18S e RPL37a, **protocolo experimental B2**, apresentados na **Figura 28C**.

Controle	Linoleico	Oleico
0,67	0,74	0,98
1,12	0,88	0,85
1,17	0,70	1,05
1,13	0,92	0,96
0,96	1,13	0,89
1,23	1,04	
1,00	0,79	0,86
0,94	0,81	0,98
0,91	1,23	1,18
1,014	0,915	0,968
± 0,056	± 0,060	± 0,038

Quadro A42: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de PCNA* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de YWHZ e Tbp, **protocolo experimental B3**, apresentados na **Figura 29A**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,19	1,44	0,07
0,74	0,19	0,08
0,70	0,70	0,05
0,82	0,06	0,09
0,85	0,06	0,22
1,45	0,07	0,10

1,32	0,04	0,13
1,21	0,12	1,14
1,035	0,335	0,235
± 0,102	± 0,175	± 0,130

Quadro A43: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Ciclina D1* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de YWHZ e Tbp, **protocolo experimental B3**, apresentados na **Figura 29B**.

Controle	Linoleico	Oleico
2,30	3,16	1,47
1,82	3,27	0,87
0,37	1,24	1,02
0,95	1,34	1,19
0,44	0,68	0,61
0,69	0,73	0,66
0,73	0,96	1,02
	1,13	0,71
1,043	1,564	0,943
± 0,277	± 0,369	± 0,103

Quadro A44: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Colágeno I* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de YWHZ e Tbp, **protocolo experimental B3**, apresentados na **Figura 30A**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,47	1,63*	0,09
1,10	0,40	0,15
0,99	0,22	0,19
0,89	0,27	0,41
0,83	0,25	0,64
0,82	0,17	0,42
0,77	0,16	0,09
1,34	0,12	0,11
1,026	0,227	0,262
± 0,091	± 0,035	± 0,071

*Considerado outlier conforme Grubbs' test -GraphPd Software

Quadro A45: Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Fibronectina* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de YWHZ e Tbp, **protocolo experimental B3**, apresentados na **Figura 30B**.

Controle	Linoleico	Oleico
	2,51*	0,12
1,81	0,74	0,38
0,58	0,07	0,10
0,37	0,11	0,26
0,65	0,18	0,34
0,90	0,18	0,14
0,79	0,07	0,16

2,08	0,11	0,10
1,026	0,208	0,200
± 0,247	± 0,090	± 0,039

*Considerado *outlier* conforme *Grubbs' test* -GraphPd Software

Quadro A46: Dados individuais e média ± EPM referentes ao conteúdo de *mRNA de Pró-Colágeno* (unidades arbitrárias) normalizados pela média geométrica do conteúdo de mRNA de YWHZ e Tbp, **protocolo experimental B3**, apresentados na **Figura 30C**.

Controle	Linoleico	Oleico
1,05	0,98	0,47
0,93	0,92	0,60
0,99	0,80	1,05
0,97	1,21	1,16
1,02	1,21	1,09
1,09	0,86	0,80
0,96	1,36	1,06
1,01	1,10	1,00
1,003	1,055	0,903
± 0,018	± 0,069	± 0,089