

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Ação da imobilização em músculos de ratos submetidos à recuperação  
nutricional após desnutrição proteica

Marcos Fábio Ribeiro de Abreu

2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCOS FÁBIO RIBEIRO DE ABREU

AÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO EM MÚSCULOS  
DE RATOS SUBMETIDOS À  
RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL APÓS  
DESNUTRIÇÃO PROTEICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Alberto Silva.

Piracicaba  
2013

## RESUMO

A homeostasia metabólica das fibras musculares é regulada de forma multifatorial, merecendo destacar a importância da integridade das vias enzimáticas citosólicas bem como na capacidade de captar adequadamente substratos metabolizáveis. Neste sentido, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos buscando compreender as ações deflagradas pelo comprometimento na atividade motora. No que tange a fisioterapia, a literatura mostra estudos desenvolvidos no intuito de aprimorar metodologias de tratamento, após lesão muscular e/ou comprometimento no controle neuromuscular, porém, em nenhum deles se observa que o estado nutricional do paciente é considerado ao se delinear o tratamento, mesmo sabendo que a desnutrição, principalmente a proteico calórica, causa danos irreversíveis ao organismo. A imobilização é uma prática terapêutica utilizada rotineiramente por diversos profissionais, frente a lesões músculo esqueléticas, neste aspecto, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da imobilização em ratos após recuperação nutricional. por 7 dias em ratos albinos Wistar controle (tratados com dieta normoproteica 14%) e recuperado nutricionalmente (tratado com dieta hipoproteica 6% 45 dias e tratado com dieta normoproteica 45 dias, RN) submetidos a imobilização. Os animais foram imobilizados com órtese de acrílico mantendo o tornozelo na posição de 90° durante 7 dias e foi estabelecido como período de remobilização e análise o sétimo dia após a retirada da órtese. Foram realizadas as seguintes avaliações: massa dos ratos e do músculo sóleo, relação proteína total/DNA do músculo sóleo, teste de tolerância a glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT), conteúdo de glicogênio e determinação da área da fibra por métodos morfométricos. Na análise estatística os dados foram comparados através de ANOVA Two Way e pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Os resultados mostraram menor peso nos animais desnutridos seguido de recuperação parcial da massa, no grupo recuperado porém com diferença significativa ao controle; verificou-se também alterações nas respostas do GTT e ITT, redução na massa do sóleo e nas reservas musculares de glicogênio significativa quando comparado ao grupo controle. No grupo de ratos recuperados pós-desnutrição houve redução significativa na área da fibra, comprometimento que não retomou a normalidade na fase após a imobilização. Cabe ressaltar que na fase de remobilização do grupo controle, houve recuperação parcial das reservas, fato que não ocorreu no grupo recuperado de desnutrição.

**Palavras-chave:** desnutrição – imobilização – músculo esquelético – recuperação nutricional

## ABSTRACT

Metabolic homeostasis of muscle fibers is regulated in a multifactorial manner, deserving highlight the importance of the integrity of cytosolic enzyme systems as well as the ability to adequately capture metabolizable substrates. In this sense, several experimental models have been developed trying to understand the actions triggered by impairment in motor activity. Regarding physical therapy, the literature shows studies developed in order to enhance treatment methodologies, after muscle injury and/or impairment in neuromuscular control, and in none of them, the nutritional status of the patient is considered to delineate the treatment even knowing that malnutrition, especially caloric protein, causes irreversible damage to the body. Immobilization is a therapeutic practice routinely used by many professionals, compared to musculoskeletal injury, in this aspect, the aim of this study was to analyze the effect of immobilization in rats after nutritional recovery. Was taken for 7 days in control albino Wistar rats (treated with normal protein diet 14 %) and nutritionally recovered (treated with diet hypoproteic 6 % 45 days and treated with normal proteic diet 45 days, RN) subjected to immobilization . The animals were immobilized with acrylic orthosis keeping the ankle in 90° position for 7 days and was established as the remobilization period of analysis the seventh day after the removal of the orthosis. The following evaluations were performed: mass of rats and the soleus muscle, relation of total protein/DNA of the soleus muscle, the glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT), glycogen content and determination of the fiber by morphometric methods. In the statistical analysis, the data were compared using ANOVA Two Way and Tukey post-test,  $p < 0.05$ . The results showed lower weight in malnourished animals followed by partial recovery of the mass , the group recovered but with a significant difference to the control , it was also noted changes in the GTT and ITT responses , reduction in mass of the soleus and the significant muscle glycogen stores when compared to the control group. In the group of rats recovered after malnutrition had significant reduction in fiber area, compromising not returned to normal after the immobilization phase. Note that the phase of remobilization of the control group, there was partial recovery of reserves, which did not occur in the recovered group of malnutrition.

**Key-words:** malnutrition – immobilization – skeletal muscle – nutritional recovery

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Órtese adaptada ao membro posterior dos ratos mantendo o tornozelo em 90°. .....23
- Figura 2: Etapas de extração e avaliação do conteúdo de glicogênio .....24
- Figura 3: Rato anestesiado sendo submetido ao teste de função pancreática ou sensibilidade insulínica .....26
- Figura 4: Massa dos animais (g) controle (C), desnutridos (D) e recuperados após desnutrição (R). A figura mostra as 6 semanas de desnutrição (1º a 12º) sendo da 1ª a 6ª o período de desnutrição e da 7ª a 12ª a recuperação nutricional. A 1ª semana representa a chegada dos animais. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=10. \*p<0,05 comparado ao controle. ....29
- Figura 5: Ratos Wistar durante as fases experimentais. 1- animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 45 dias; 2- animal tratado com dieta hipoproteica (AN - 6%) durante 45 dias (desnutrido); 3- animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 90 dias; 4- animal recuperado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 45 dias após a desnutrição. ....29
- Figura 6: Área sob a curva (mg/dL/120min) dos grupos controle, desnutridos e recuperados após desnutrição. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=6. \*p<0.05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao desnutrido. ....31
- Figura 7: Constante de decaimento da glicemia (ITT = %/min) dos grupos controle, desnutridos e recuperados após desnutrição. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=6. p<0.05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao desnutrido.....32
- Figura 8: Concentração de glicogênio do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado, b p<0,05 comparado ao recuperado imobilizado. ....33
- Figura 9: Concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio branco de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as

médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado.....34

Figura 10: Concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio vermelho de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado.....34

Figura 11: Peso do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado.....35

Figura 12: Relação proteína total/DNA (mg/100mg) do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado.....36

Figura 13: Média $\pm$ dp da área do músculo sóleo ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle, imobilizado, recuperado após desnutrição e recuperado após desnutrição e imobilizado, n:5. \*p<0,05 comparado ao grupo controle, #p<0,05 comparado ao imobilizados, ~p<0,05 comparado ao recuperado.....37


Figura 14: Fotomicrografia de um sóleo nas condições controle, imobilizado e recuperado após desnutrição e recuperado após desnutrição e imobilizado. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle. A barra de calibração é de  pra todas as figuras.....38

Figura 15: Índice de ingesta (g) de animais controle e desnutrido. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle.....39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos ratos em grupos experimentais. ....	21
Tabela 2 - Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição .....	22
Tabela 3 - Concentração Plasmática de Proteínas Totais e Albumina (mg/100mg) de ratos controle, desnutridos e recuperados. Os valores representam as médias $\pm$ epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle. ....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS - Organização Mundial da Saúde

GTT – Teste de Tolerância à Glicose

ITT – Teste de Tolerância à Insulina



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Animais .....	20
3.2 Protocolo de desnutrição e recuperação nutricional. ....	21
3.3 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO .....	22
3.4 Determinação do peso dos animais, e peso do sóleo.....	23
3.5 Determinação do glicogênio muscular .....	23
3.6 Determinação da concentração plasmática de Proteínas totais e Albumina .....	24
3.7 Teste de Tolerância à Insulina (ITT) .....	24
3.8 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) .....	25
3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	26
3.10 Análise da secção transversa das fibras musculares.....	26
4. RESULTADOS .....	28
5. DISCUSSÃO .....	40
6. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a comunidade científica tem expressado grande preocupação no que se refere ao estado nutricional da população, uma vez que, é consenso que a boa alimentação é base para o desenvolvimento de diferentes sistemas, tais como: musculoesquelético, endócrino, imunológico, entre outros. Assim, reitera-se que a preocupação deve vir desde a gestação, pois o desenvolvimento humano se dá a partir da vida intrauterina, e para sua boa formação é importante que haja uma boa alimentação da mãe para um bom desenvolvimento do embrião (Golden, 2010).

Os distúrbios alimentares mais comumente achados são a obesidade e a desnutrição, que por sua vez é a ingesta deficitária de nutrientes essenciais para o bom funcionamento do organismo. Apesar de estar do evidente crescimento da população obesa e da significativa diminuição dos desnutridos, ainda são muitos os casos de desnutrição encontrados no mundo, principalmente em países pobres. (Jahoor et al., 2006)

O tipo de desnutrição está relacionado à sua origem, ou seja, irá depender de qual nutriente o organismo está sendo privado, podendo ser então induzida pela deficiência protéica, vitamínica, calórica, de minerais ou ainda a combinação destes componentes (Monte, 2000).

Dentre os tipos citados acima, o quadro de desnutrição mais comum, é a carência de proteína. A redução no oferecimento desse nutriente na dieta, promove severas alterações no organismo estando elas relacionadas com a redução do crescimento e do peso (Schafer et al., 2008), uma vez que a ação primária do organismo, após submetido a um déficit proteico, é reduzir o gasto

energético alterando o conteúdo de gordura corporal e conseqüentemente, o peso do corpo (Barac-Nieto et al., 1978).

Deste modo, tem sido descrito que o déficit proteico afeta a formação de hormônios e enzimas que atuam diretamente no processo de desenvolvimento do peso e de crescimento (Neiva, Guerino e Mello, 1999).

É sabido que a desnutrição protéico-calórica é uma das principais causas de mortalidade infantil no Brasil, sendo definida segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma variedade de condições patológicas decorrentes das deficiências de energia e proteínas, em proporções variadas. Já foi descrito que a desnutrição proteico-calórica traz déficits importantes para o desenvolvimento humano, que quanto mais precoce ocorrer e mais tempo permanecer instalado no indivíduo, maiores serão esses déficits, assim como menor será a possibilidade de revertê-los (Barreto et al., 2012).

Uma dieta pobre em proteína (8% de caseína) durante o período gestacional, promoverá alterações permanentes na estrutura e na funcionalidade do sistema nervoso central, bem como na expressão de neurotransmissores orexigênicos e anorexigênicos, na expressão de genes envolvidos com a regulação de sensores de nutrientes hipotalâmicos e no controle do metabolismo alterando assim o apetite e sensação de saciedade do da criança (Orozco-Solis et al, 2009; 2010; Barreto et al, 2012; Falcão e Santos, 2012).

Cabe ressaltar, que o papel materno se torna fundamental na infância, uma vez que os principais hábitos alimentares são adquiridos na primeira infância e são carregados por toda a vida (D'Óvidio, 2007). Além da dieta

deficitária, outros fatores promovem a desnutrição, como a má absorção intestinal, perda anormal de nutrientes através de doenças como diarreia, hemorragia, insuficiência renal ou sudorese excessiva (Schafer et al., 2008).

A desnutrição é uma doença que acomete principalmente a população de países pobres e em desenvolvimento. No Brasil houve melhora no panorama, no entanto a mesma ainda se apresenta em valores bem altos, tendo 30,7% de suas crianças na faixa etária de 0 à 5 anos com desnutrição. A cada ano, 9 milhões de crianças abaixo de 5 anos morrem e essa deficiência nutricional é responsável por um terço dos casos. (Coutinho, Gentil e Toral, 2008).

Estudos mostram que crianças de famílias com extrema pobreza apresentam menor peso ao nascimento, maiores taxas de mortalidade, internações hospitalares e principalmente maiores índices de desnutrição (Issler et al., 1996). Visto isso, descrito que crianças matriculadas em escolas municipais apresentam mais frequentemente déficit de peso e altura quando comparadas com as de escolas particulares (Guardiola, Egewarth e Rotta, 2001).

Estima-se que cerca de 20% dos indivíduos desnutridos atingem a vida adulta com uma estatura inferior ao esperado. Quando inseridos no mercado de trabalho apresentam limitações no desempenho e por isso ganho inferior aos demais. Por esse motivo, tendem a morar nas regiões periféricas das cidades e a criarem filhos com tendência a serem desnutridos (Issler et al., 1996). Algumas medidas básicas podem ser criadas para que haja uma menor incidência como, por exemplo, uma melhor distribuição de renda entre as

classes trabalhadoras e uma maior disponibilidade de alimentos para tais (Latorraca et al., 1998).

Além disso, é importante saber que várias são as alterações metabólicas que ocorrem no organismo que serão percebidas de acordo com a fase de desenvolvimento do indivíduo e com o tempo de instalação da mesma. Desse modo, podemos classificar a desnutrição em três níveis, onde o primeiro grau, é aquele no qual o déficit de peso é superior a 10% da média considerada normal, o de segundo grau 25% e de terceiro grau 40% (Huber et al., 2013).

A desnutrição de terceiro grau é a mais grave e pode ser subdividida em outras duas categorias. O marasmo, que é caracterizado pela perda de tecido muscular e adiposo, com diminuição de 60% do peso corporal esperada pela idade (Trusswell, 1981; Golden, 2010). E o kwashiorkor, caracterizado pela perda do tecido muscular, e preservação do tecido adiposo devido ser a única fonte de energia disponível (Waterlow, 1984).

No marasmo o indivíduo apresenta um menor déficit proteico, comparado com o kwashiorkor, tendo então uma diferença na composição corporal entre ambos, assim como se diferenciam também no *turnover* de proteínas e lipídios sendo maior e menor respectivamente no kwashiorkor (Jahoor, 2006; Reid, 2004, Badaloo, 2002).

Há um caso mais severo de desnutrição, onde o indivíduo com kwashiorkor apresenta menor concentração intracelular e baixa síntese do antioxidante de glutathione. Nesse problema, o índice de mortalidade é maior devido a gravidade (Badaloo, 2002).

A resposta metabólica à desnutrição severa nos pacientes com marasmo está em manter o suprimento de aminoácidos e lipídios durante o período da dieta deficitária, entretanto, no kwashiorkor, há uma grande supressão da quebra de proteína, criando uma diminuição de aminoácidos essenciais e condicionais, alterando assim o metabolismo proteico, enquanto que a redução da disponibilidade de lipídios altera o metabolismo energético. (Golden, 2010; Jahoor, 2006).

Por conta das várias alterações metabólicas que ocorrem na desnutrição, diversas adaptações funcionais acontecem durante o desenvolvimento, visando preservar a homeostase do meio interno (Waterlow, 1984).

Já foi descrito em humanos e animais de experimentação, que a desnutrição protéica durante o período pré-natal leva a mudanças permanentes, e que na fase adulta leva a deficiências do controle da pressão sanguínea, metabolismo do colesterol, resposta imunológica, secreção de insulina, ingestão de glicose, predisposição do organismo a obesidade, doenças vasculares e diabetes mellitus. (Barker, 1999; Ravelli, 1976).

Essas alterações na fase adulta são uma repercussão da agressão no período crítico do desenvolvimento, sendo que estas são propostas através da plasticidade fenotípica, que é a capacidade do indivíduo em modificar o fenótipo de acordo com alterações ambientais (Gluckman, 2005).

Essas alterações podem ser de ordem química ou física e estar presente em diversas estruturas, como por exemplo, o hipotálamo, que tem papel importante para o controle da homeostase energética (Wauben, 1999), além de

centro regulador do comportamento alimentar, atuando no metabolismo energético do músculo (Wilson, 1988; Plagemann, 2000).

O tecido muscular esquelético funciona como um reservatório de proteína, entretanto, de acordo com Nascimento et al (1991), quando há déficit protéico na dieta, o tecido é alvo de depleção. Algumas alterações foram observadas, como a diminuição do diâmetro da fibra muscular onde nestas foi verificado que os espaços intercelulares se encontravam alargados, contendo vasos capilares, fibroblastos e escasso colágeno fibrilar; não houve aumento do colágeno intersticial e a estrutura miofibrilar e miofilamentar foram mantidas.

Por essa razão é fundamental a recuperação nutricional, principalmente nas primeiras fases da vida, para que haja o desenvolvimento e crescimento normal, antes que as alterações permanentes se instalem (Gigante et al., 2007).

Mesmo após uma reabilitação nutricional adequada ainda pode haver consequências que causem alterações estruturais, neuroquímicas e comportamentais irreversíveis, principalmente se ocorrer no período crítico de desenvolvimento considerado o terceiro trimestre de gestação até o segundo ano de vida (Dobbing, 1974; Smart, 1993).

Sendo assim, com todas as alterações metabólicas e estruturais da desnutrição, a exposição a lesão, principalmente musculoesquelética se torna maior, e como tratamento principal para esse tipo de lesão, é bastante utilizado a imobilização do membro (Dirks et al., 2013).

Neste contexto, os estudos dos efeitos metabólicos locais e sistêmicos da imobilização se revestem de grande importância por fornecer as

informações necessárias para a compreensão e intervenção terapêutica e preventiva tanto nas situações de privação da mobilidade de partes do corpo, como no repouso prolongado no leito, haja vista que a imobilização musculoesquelética é recurso terapêutico com vasta aplicabilidade prática no campo da ortopedia e medicina esportiva (Kannus et al., 1998)

A imobilização é bastante utilizada na prática médica para o tratamento de entorses, fraturas ósseas, rupturas ligamentares, tendíneas e outros tecidos moles, doenças degenerativas, lesões musculares e articulares, e também após cirurgias ou como tratamento conservador. Sendo assim, leva a um desuso muscular, gerando uma gama de efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, fibrose intramuscular, redução da densidade dos capilares, da extensibilidade muscular, e da limitação da mobilidade articular (Józsa et al., 1990).

A imobilização musculoesquelética causa também alterações adaptativas como perda funcional global e local principalmente perda de massa muscular e óssea, haja visto que nestas condições, o sistema músculo-esquelético gera respostas adaptativas visando ajustar a capacidade funcional do sistema para gerar a máxima eficiência com o menor consumo energético possível (Bodine et al., 2013).

A atrofia do músculo esquelético decorrente da imobilização ocorre pela diminuição dos níveis de síntese e conseqüentemente aumento nos níveis de degradação proteica (Durigan et al., 2005; 2006), onde é visto que nas primeiras 6 horas de imobilização já existe uma redução de 37% nos índices de síntese protéica (Wall et al., 2013).



Para a realização da imobilização no campo da experimentação, inúmeros estudos foram realizados para aperfeiçoar o conhecimento dos eventos deflagrados pelo desuso, fundamentado em diferentes técnicas como a desnervação (Coderre et al., 1992), tenotomia (Jakubiec-Puka et al., 1992; Abrams et al., 2000), fixação da articulação por meio de pinos e bloqueio químico da junção neuromuscular (Hirose et al., 2000), suspensão do corpo (Tanaka et al., 2004), órtese de tecido de algodão (Coutinho et al., 2006), talas de gesso (Heslinga et al., 1995) e órtese de resina acrílica (Silva et al., 2006).

A importância dessas práticas experimentais se dá devido ao desuso muscular levará um comprometimento da homeostasia da musculatura tendo por consequência a resistência insulínica, redução das reservas de glicogênio, afetando a síntese de proteínas da miofibrila, assim como a eficácia do sinal metabólico, além da redução de força e resistência a fadiga (Henriksen et al., 1991; Silva e Almeida, 2006).

Para esse estudo, utilizou-se o modelo de imobilização com órtese de resina acrílica, proporcionando uma imobilização na articulação do tornozelo em angulação de 90°, permitindo deambulação com descarga de peso no membro imobilizado, uma vez que o modelo deixa livre parte da pata do animal, além de permitir mobilidade das articulações do joelho e quadril.

Tendo em vista a desnutrição como um fator de risco em potencial para o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças, a identificação deste atraso é fundamental para a intervenção precoce (Miranda, Resegue, Figueiras, 2003).

Frente os efeitos deletérios causados pela imobilização, a fisioterapia ortopédica é de grande importância, pois objetiva o trabalho da funcionalidade

através de posturas e movimentos, além de associar a terapia ao processo de ensino e aprendizagem motora, desta forma tornando-a mais efetiva e completa (Almeida et al., 2004; Adalbjornsson, 2001).

## **HIPÓTESE**

Tendo como referência as alterações geradas pela desnutrição proteica bem como o possível comprometimento que acompanha a recuperação nutricional, a hipótese do trabalho é que ratos recuperados após desnutrição proteica apresentam deficiência na recuperação das reservas energéticas, bem como na composição estrutural da musculatura esquelética, após imobilização.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar o comportamento das reservas glicogênicas, da relação proteína total/DNA e a morfometria do músculo sóleo de ratos recuperados após desnutrição, submetidos a imobilização e remobilização.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar a massa dos animais durante as fases de desnutrição e recuperação nutricional.
- Avaliar a sensibilidade à insulina e a resposta do pâncreas frente à glicose nos grupos controle, desnutridos e recuperados pós-desnutrição.
- Determinar as concentrações plasmáticas de Proteínas totais e Albumina.
- Avaliar as reservas glicogênicas musculares de ratos controle, desnutridos e recuperados após desnutrição, bem como o comportamento destas reservas na fase pós-imobilização.
- Realizar uma avaliação histológica no músculo sóleo de ratos controle e recuperados após desnutrição quando submetidos à imobilização.
- Verificar o índice de ingesta dos ratos controle e recuperados nutricionalmente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

**Procedência e manutenção:** Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (*Rathusnovergicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), desmamados no 21º dia de vida, pesando de 38 a 58 g, provenientes da empresa ANILAB® (Paulínia). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 4 animais cada, recebendo água e alimentação *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo protocolo 011/2011.

Foram aleatoriamente divididos em grupos apresentados na tabela 1. Os ratos do grupo controle foram alimentados com dieta normoproteica AIN 93 contendo 14% de proteína, enquanto os desnutridos foram tratados com dieta hipoproteica contendo 6% de proteína por 45 dias (tabela 2). O grupo recuperado foi submetido ao protocolo de desnutrição (45 dias) seguido da recuperação nutricional quando foram alimentados com dieta contendo 14% de proteína por mais 45 dias.

**Tabela 1 – Distribuição dos ratos em grupos experimentais.**

<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Controle	6
Imobilizados por 7 dias	6
Remobilizados por 7 dias	6
Desnutrido	6
Desnutrido imobilizado	6
Recuperado nutricionalmente	6
Recuperado nutricionalmente imobilizados	6

OBS. Os grupos controle, desnutrido e recuperado foram duplicados de acordo com a necessidade experimental.

### **3.2 Protocolo de desnutrição e recuperação nutricional.**

Durante o experimento foram empregadas dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) comercializada por PragSoluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE: 401.091.476.112-ME (composição descrita na tabela 2).

**Tabela 2 - Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição**

<b><i>Dieta AN 93 M -14%</i></b>		<b><i>Dieta AN - 6% proteína (desnutrição)</i></b>	
Ingredientes	p/1 Kg	Ingredientes	p/1 Kg
Amido de milho	465.700	Amido de milho	508.000
<b>Caseína</b>	<b>140.000</b>	<b>Caseína</b>	<b>66.000</b>
Amido dextrinizado	155.000	Amido dextrinizado	166.500
Sacarose	100.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.000
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
<b>TOTAL</b>	<b>1000.0</b>	<b>TOTAL</b>	<b>1000.0</b>

### **3.3 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO**

A imobilização foi realizada após 90 dias, respeitando o período do protocolo de nutrição, desnutrição e recuperação nutricional. Utilizando-se de uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90°, permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres conforme modelo descrito por Silva et al. (2006). Consideramos os períodos experimentais como sendo períodos agudos, sendo descrito que até 7 dias de imobilização ainda é considerado dessa forma.

Neste sentido, como protocolo de remobilização, os animais tiveram a órtese retirada locomovendo-se livremente pela caixa.



**Figura 1:** Órtese adaptada ao membro posterior dos ratos mantendo o tornozelo em 90°.

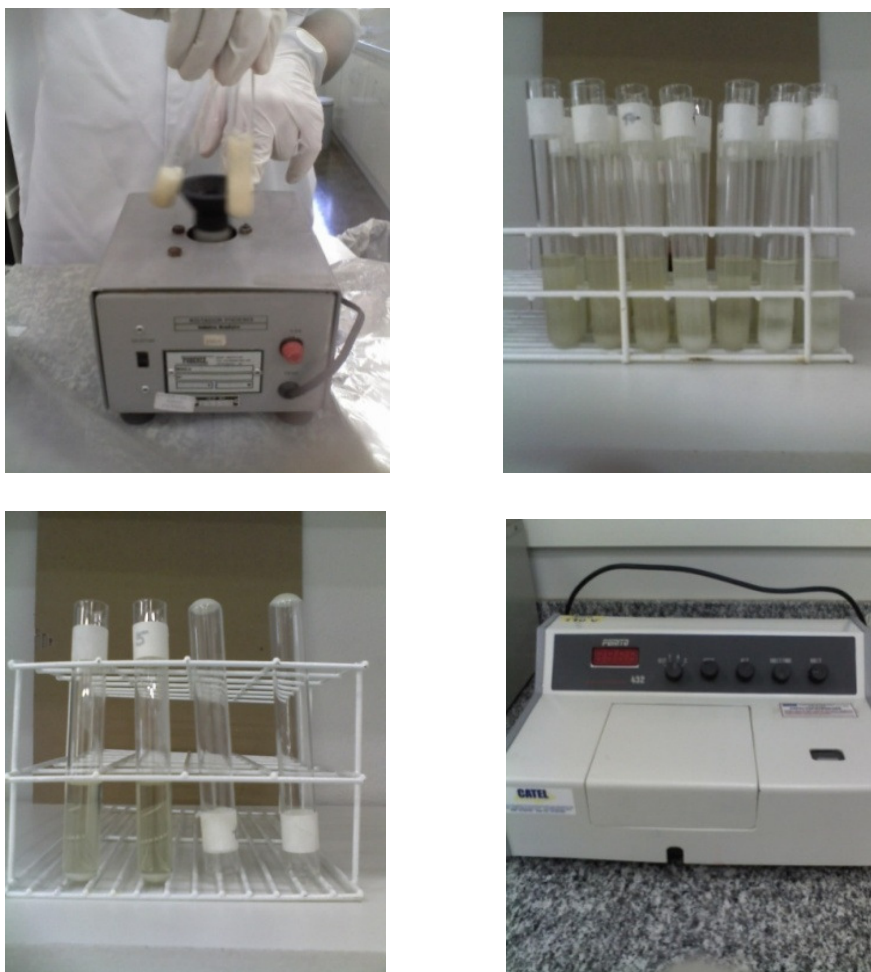
### 3.4 Determinação do peso dos animais, e peso do sóleo

O peso dos órgãos, das amostras bem como a ingesta sólida de dieta foram determinados com auxílio de balança eletrônica (Filizola ®).

### 3.5 Determinação do glicogênio muscular

Após anestesia com tribromoetanol (2,5%,ip), amostras do músculo sóleo, gastrocnêmio porção branca e gastrocnêmio porção vermelha, foram coletadas e submetidas a digestão em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000rpm durante 15 minutos e o glicogênio foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a

proposta de Siu et al. (1970) mostrado na figura 2. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.



**Figura 2:** Etapas de extração e avaliação do conteúdo de glicogênio

### **3.6 Determinação da concentração plasmática de Proteínas totais e Albumina**

As concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina foram determinadas através de kit de uso laboratorial (Protal – Labtest ).

### **3.7 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)**

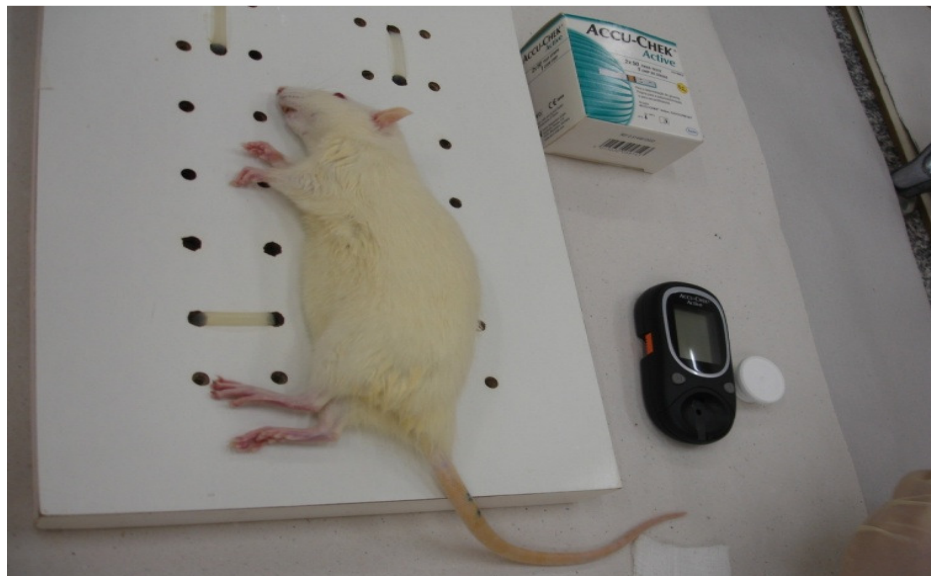


Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (2,5%, ip) e após 10 minutos da indução anestésica, foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste, determinando o tempo zero.

A seguir foi administrado insulina (2 U/Kg, ip - Biohulin) seguido de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho et al., 2007).

### **3.8 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)**

Para avaliação do GTT, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5%,ip) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado glicose (2 g/Kg, ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho et al., 2007) (figura 3).



**Figura 3:** Rato anestesiado sendo submetido ao teste de função pancreática ou sensibilidade insulínica

### **3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

#### **Processamento das amostras do tecido muscular**

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o músculo sóleo foi exposto, retirado, pesado e em seguida, o seu segmento ventral foi colocado em solução tamponada de formol a 10% para fixação. Foi processado também, o sóleo do membro contralateral.

Após 48 horas de fixação, as peças passaram por desidratação em álcool etílico e diafanização em xilol, sendo incluídas em paraplast. Cortes transversais não seriados de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram feitos da porção ventral do músculo sóleo, que foram corados por Hematoxilina-Eosina (H:E).

#### **3.10 Análise da secção transversa das fibras musculares**

Segmentos do ventre do músculo sóleo foram fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados para inclusão em paraplast.

Utilizou-se cortes não seriados de 7  $\mu\text{m}$  de espessura que foram corados com hematoxilina-Eosina (HE).

Foram selecionados 20 cortes nos quais foram escolhidas 15 imagens com áreas iguais e para a captação e análise das imagens, utilizando-se um *software* Image Pró-plus® 6.2, e uma câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 20x. Para a análise da secção transversa das fibras foi utilizado uma tela quadriculada, composta por 80 quadrados, com 63 intersecções de retas. A intersecção de retas que coincidia na fibra muscular, era delimitada e o programa gerava um número correspondente à área da fibra, sendo analisadas 10 fibras por área, escolhidas de forma aleatória. Foram analisadas 300 fibras musculares em cada grupo experimental (Mandarim De Lacerda, 2010).

### **Análise estatística**

Na análise estatística foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA e do teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

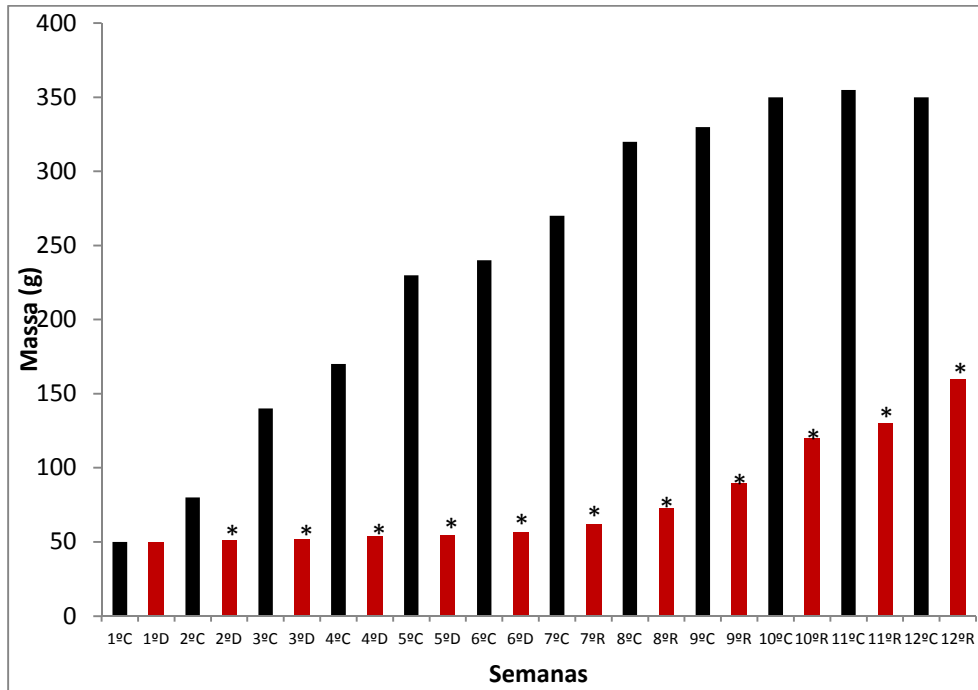
#### 4. RESULTADOS

O estudo iniciou com a caracterização do quadro de desnutrição e posterior recuperação nutricional em ratos wistar.

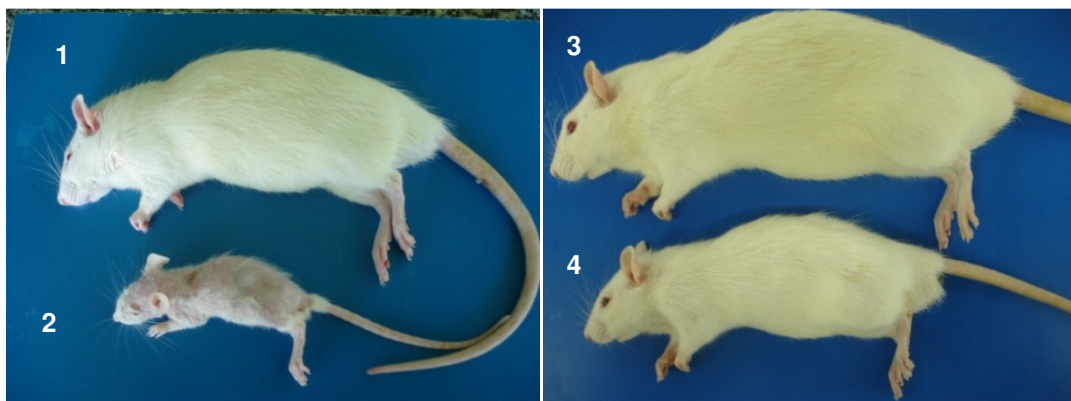
Nesta caracterização, foi observado a progressão do ganho de massa (peso), a qual está demonstrado na figura 4, onde pode-se observar que o grupo controle apresentou expressiva variação de peso nas 6 primeiras semanas, sendo representado por valores 79,8%, 44,7%, 24%, 26,1%, 16%, 18% e sequencialmente da 7<sup>ª</sup> a 12<sup>ª</sup> semana observa-se menor ganho estabilizando a variação entre 10%, 3,5%, 4%, 8%, 4% e 7,8%.

No mesmo contexto de análise, os ratos desnutridos apresentam pequena variação na massa, fato também observado na recuperação nutricional, estando representado por valores 10% maiores nas 6 primeiras semanas de desnutrição. Na fase de recuperação, os valores da 7<sup>ª</sup> a 12<sup>ª</sup> semana estiveram assim representados, 7%, 10%, 33,8%, 17,6%, 19,5% e 29,2%, respectivamente.

Esta avaliação mostra que o rato desnutrido apresentou peso inferior ao rato controle e passou a apresentar maior aumento de peso após ter sido tratado com a dieta normoproteica, todavia, mesmo após a recuperação nutricional, o rato desnutrido não conseguiu atingir o mesmo peso que o rato controle. Neste contexto, a figura 5 mostra o status dos animais nas diferentes condições experimentais.



**Figura 4:** Massa dos animais (g) controle (C), desnutridos (D) e recuperados após desnutrição (R). A figura mostra as 6 semanas de desnutrição (1<sup>o</sup> a 12<sup>o</sup>) sendo da 1<sup>a</sup> a 6<sup>o</sup> o período de desnutrição e da 7<sup>o</sup> a 12<sup>o</sup> a recuperação nutricional. A 1<sup>a</sup> semana representa a chegada dos animais. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=10. \*p<0,05 comparado ao controle.



**Figura 5:** Ratos Wistar durante as fases experimentais. 1- animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 45 dias; 2- animal tratado com dieta hipoproteica (AN - 6%) durante 45 dias (desnutrido); 3- animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 90 dias; 4- animal recuperado com dieta normoproteica (AN 93 - 14%) durante 45 dias após a desnutrição.

Completando a caracterização do status de desnutrição, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de proteína total e albumina, valores esses expressos na tabela 3, onde verifica-se uma menor concentração plasmática em ratos desnutridos, confirmando então um quadro de desnutrição. Pode-se verificar ainda, que após a recuperação nutricional as concentrações não diferiram do controle.

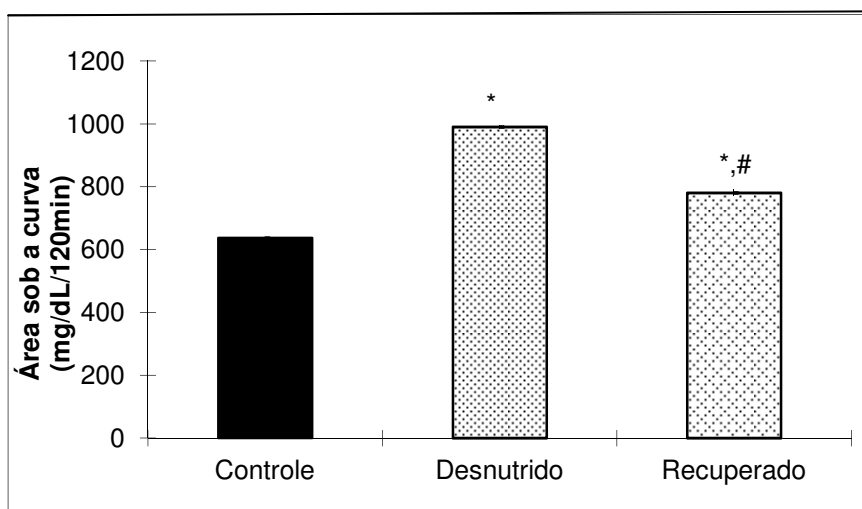
**Tabela 3** - Concentração Plasmática de Proteínas Totais e Albumina (mg/100mg) de ratos controle, desnutridos e recuperados. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle.

	Proteínas Totais	Albumina
Controle	12 $\pm$ 1,6	0,32 $\pm$ 0,01
Desnutridos	8,3 $\pm$ 2,1*	0,20 $\pm$ 0,02*
Recuperados	9,3 $\pm$ 2,1	0,27 $\pm$ 0,03

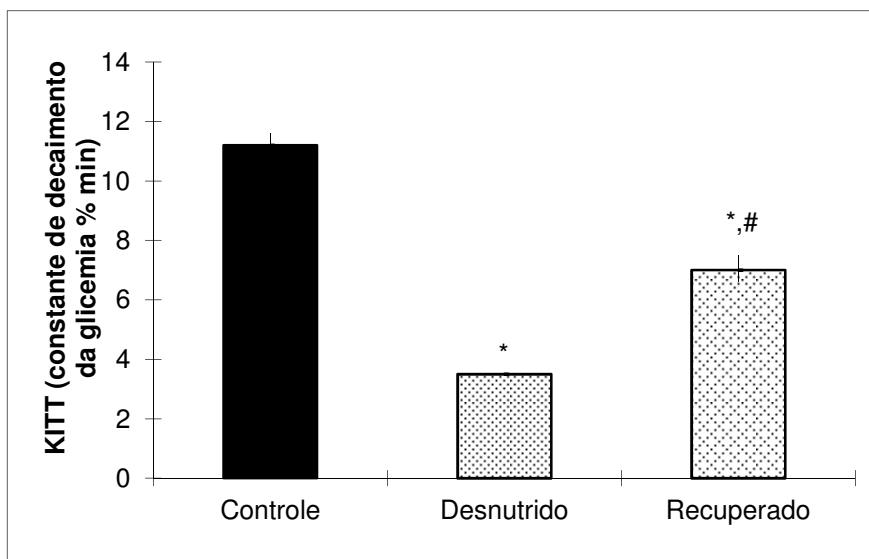
Na sequência da análise, o estudo foi direcionado às provas de função secretória de insulina frente a sobrecarga de glicose e a responsividade tecidual a insulina. Para esta avaliação foram realizados dois testes, ou seja, o teste de tolerância à glicose (GTT) e o teste de tolerância à insulina (ITT).

No GTT foi observado que a área sob a curva foi 40% maior no grupo desnutrido se comparado ao grupo controle, por sua vez, no grupo recuperado a área apresentou-se 20% menor se comparado ao desnutrido, porém, ainda 20% maior que o controle (figura 6).

Na avaliação do ITT foi observado redução de 72% na constante de decaimento de glicose (KITT), indicando redução na sensibilidade insulínica tecidual. Quanto ao grupo recuperado, foi observado valores 100% maiores se comparado ao desnutrido, mas, ainda permaneceu 26% menor que o controle, fato indicativo de ressensibilização tecidual (figura 7).



**Figura 6:** Área sob a curva (mg/dL/120min) dos grupos controle, desnutridos e recuperados após desnutrição. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=6. \* $p < 0.05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao desnutrido.



**Figura 7:** Constante de decaimento da glicemia (ITT = %/min) dos grupos controle, desnutridos e recuperados após desnutrição. Os valores correspondem a média  $\pm$  epm, n=6.  $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao desnutrido.

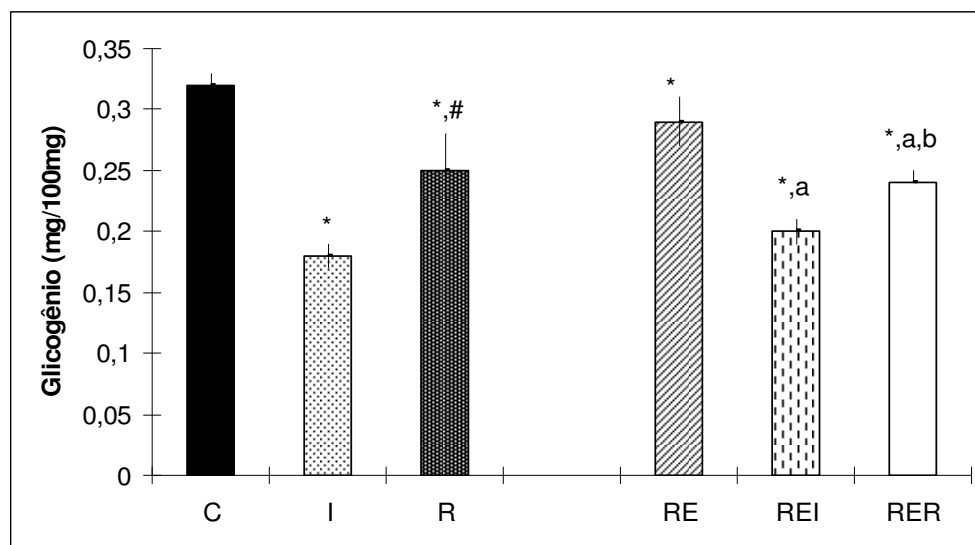
Após identificar a modificação na responsividade insulínica, passou-se a verificar o comportamento das reservas glicogênicas do músculo sóleo. Ao considerar-se a imobilização, foi observado que houve uma intensa redução nas reservas induzida pelo desuso atingindo 50%. Nesta mesma linha de análise, foi observado que após a remobilização, as reservas foram recuperadas, atingindo valores 25% menores que o controle.

O grupo de ratos recuperados nutricionalmente apresentou concentrações de glicogênio inferiores ao grupo controle e, além disto foi observado que a imobilização promoveu redução ainda maior no conteúdo muscular de glicogênio e, apesar de apresentar melhora significativa na fase de remobilização, não foi suficiente para retornar aos valores controle (recuperados), resultados descritos na figura 8.

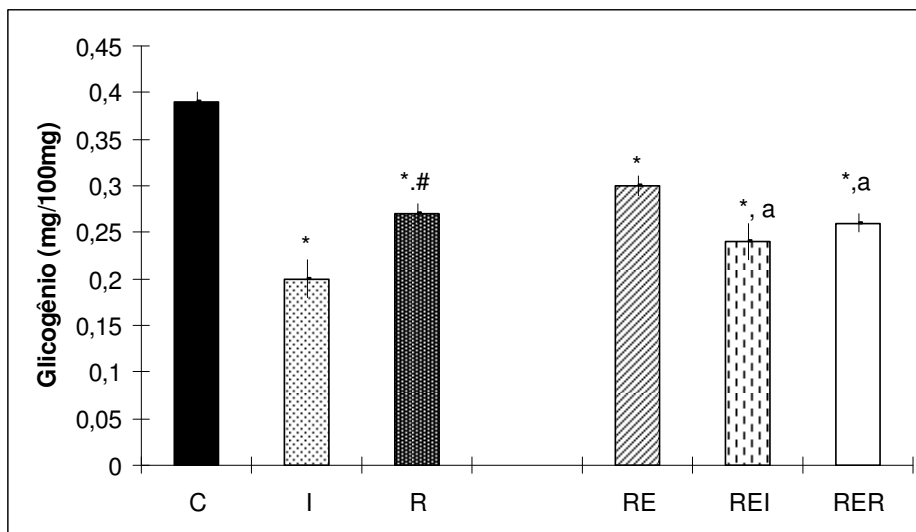
Também foram avaliadas as concentrações de glicogênio no músculo gastrocnêmio, porção branca e vermelha, músculo no qual foi verificado que as



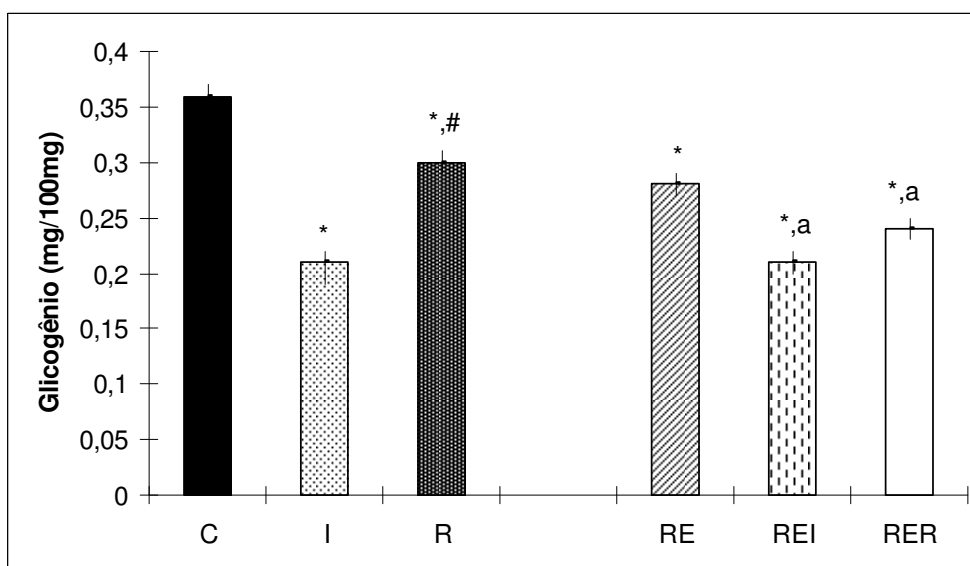
reservas estavam menores se comparado ao controle e ainda, a imobilização promoveu diminuição no conteúdo glicogênico em intensidade similar ao verificado no músculo sóleo. Com relação a fase de remobilização, não foram observadas concentrações similares a fase não imobilizado, como pode ser observado nas figuras 9 e 10.



**Figura 8:** Concentração de glicogênio do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm,  $n=6$ . \* $p<0,05$  comparado ao controle, # $p<0,05$  comparado ao imobilizado, a  $p<0,05$  comparado ao recuperado, b  $p<0,05$  comparado ao recuperado imobilizado.



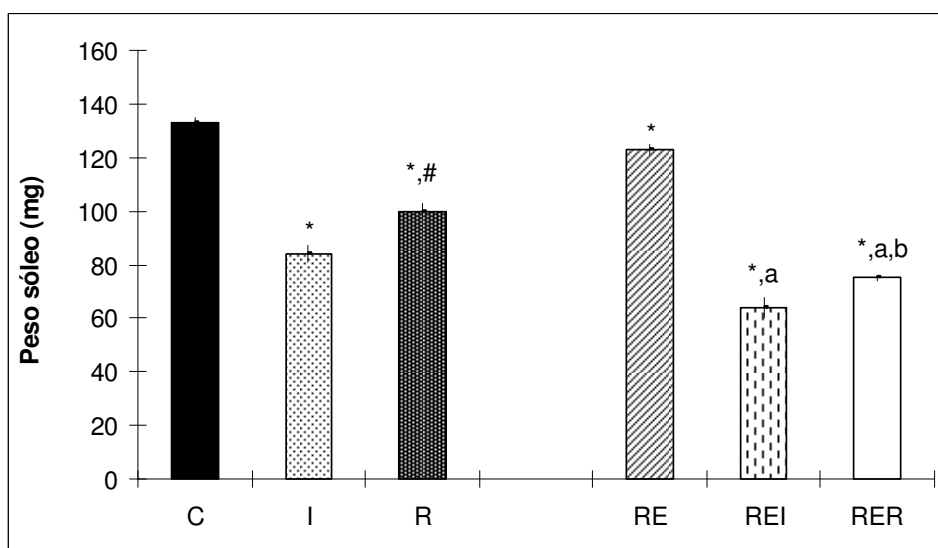
**Figura 9:** Concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio branco de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao imobilizado, a  $p < 0,05$  comparado ao recuperado.



**Figura 10:** Concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio vermelho de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao imobilizado, a  $p < 0,05$  comparado ao recuperado.

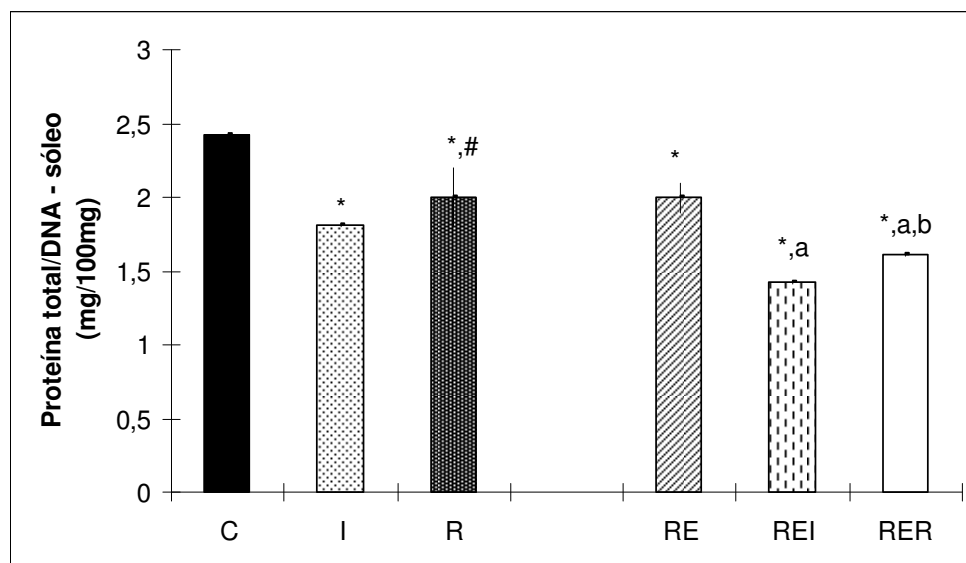
Tendo em vista as alterações energéticas, foi avaliado a massa do músculo sóleo nas mesmas condições, sendo escolhido devido a fácil identificação dos limites anatômicos. Foi verificado que o sóleo do grupo imobilizado apresentou peso inferior se comparado com o controle, porém durante a remobilização, houve uma melhora significativa, contudo, ainda inferior ao controle, não havendo recuperação total do seu peso.

No grupo recuperado após desnutrição, o sóleo apresentou massa inferior ao controle e quando submetido a imobilização, houve redução ainda mais significativa. Merece destacar-se que o grupo recuperado, quando remobilizado, apresentou aumento significativo da massa, se comparado ao recuperado imobilizado, todavia, ainda inferior ao controle (figura 11).



**Figura 11:** Peso do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm,  $n=6$ . \* $p<0,05$  comparado ao controle, # $p<0,05$  comparado ao imobilizado, a  $p<0,05$  comparado ao recuperado.

De maneira complementar, também foi analisada a relação proteína total/DNA (PT/DNA) do sóleo (figura 12) e foi observado que os músculos imobilizados apresentaram uma relação PT/DNA estatisticamente menor do que o controle e quando remobilizado, obteve-se uma melhora, porém, o valor ainda ficou estatisticamente inferior ao controle. No grupo recuperado, foi observado relação inferior ao controle e quando submetido a imobilização, observou-se uma perda significativa, a qual não foi recuperada na remobilização.

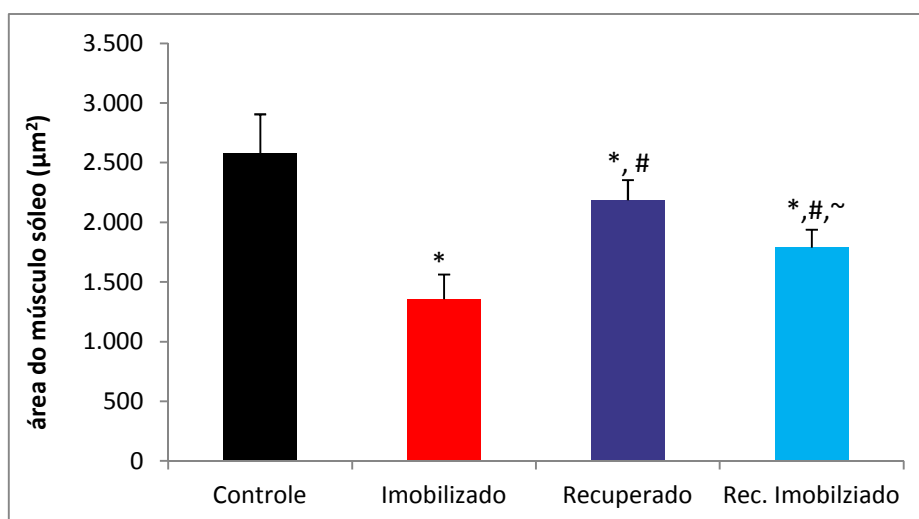


**Figura 12:** Relação proteína total/DNA (mg/100mg) do músculo sóleo de animais controle (C), imobilizados (I), remobilizado (R), recuperado (RE), recuperado imobilizado (REI), recuperado remobilizado (RER). Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, a p<0,05 comparado ao recuperado.

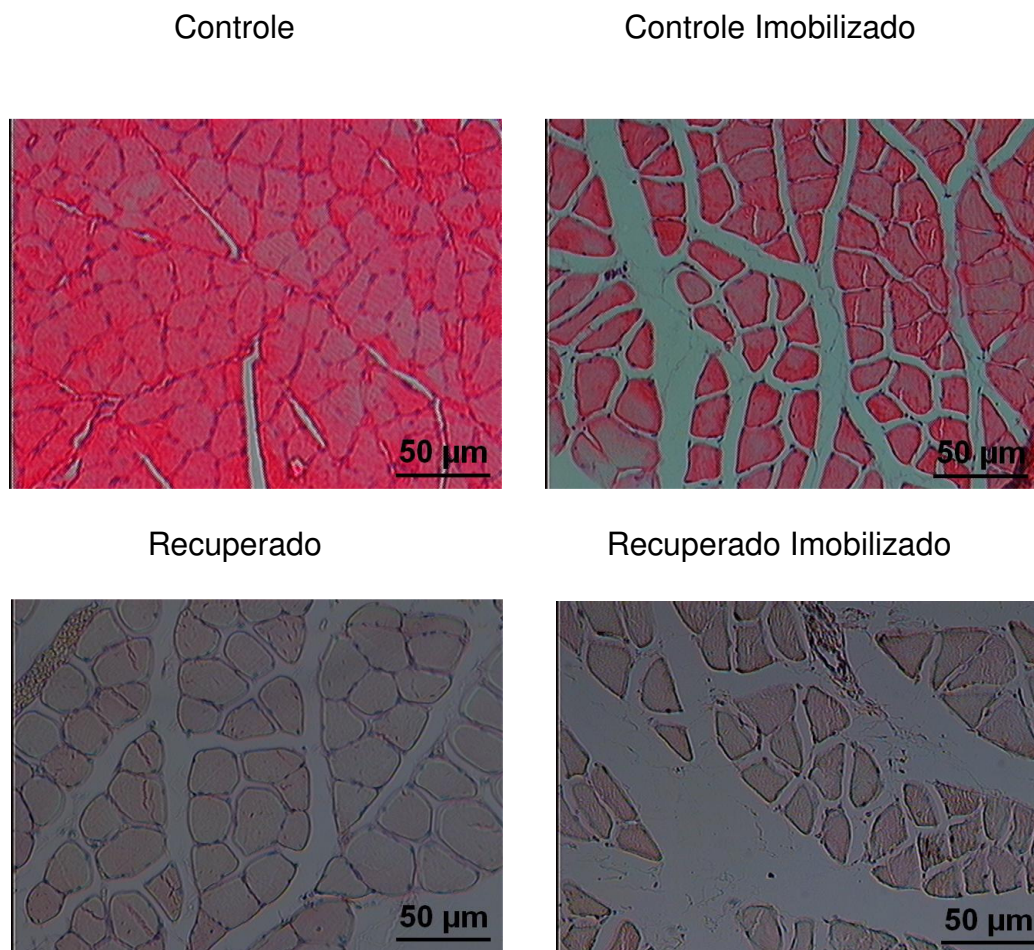
A avaliação morfométrica realizada no sóleo mostrou redução de 47% na área das fibras do mesmo ( $\mu\text{m}^2$ ) em decorrência da imobilização. A avaliação direcionada ao músculo do grupo recuperado após desnutrição


mostrou que estes apresentam fibras com área 20% menor, sugerindo que esta redução se deve a desnutrição desenvolvida nas fases iniciais do desenvolvimento. Além disso, quando o grupo recuperado foi submetido a imobilização foi verificado que as fibras apresentaram redução de 18% da área como mostra a figura 13 e representado na morfologia na figura 14.

Fato interessante é que as fibras do sóleo, recuperado após desnutrição, apresentaram-se menores que as fibras dos músculos controle e a imobilização proporcionou redução adicional e similar nos músculos normais imobilizados.

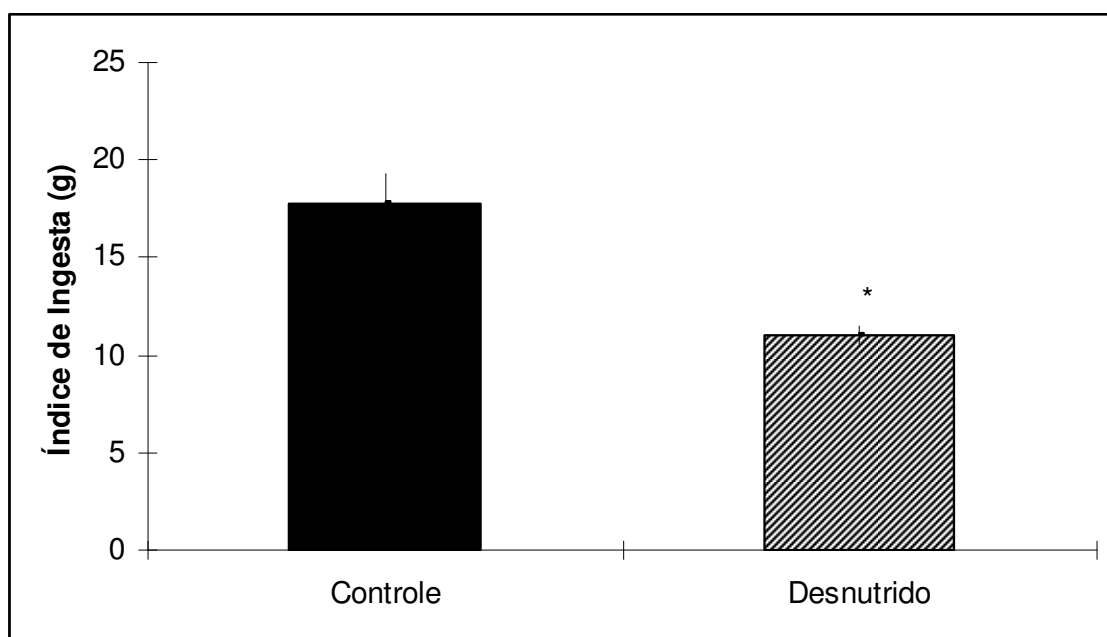


**Figura 13:** Média±dp da área do músculo sóleo (µm<sup>2</sup>) dos grupos controle, imobilizado, recuperado após desnutrição e recuperado após desnutrição e imobilizado, n:5. \*p<0,05 comparado ao grupo controle, #p<0,05 comparado ao imobilizados, ~p<0,05 comparado ao recuperado.



**Figura 14:** Fotomicrografia de um sóleo nas condições controle, imobilizado e recuperado após desnutrição e recuperado após desnutrição e imobilizado. Os valores representam as médias  $\pm$  epm,  $n=6$ .  $*p<0,05$  comparado ao controle. A barra de calibração é de  para todas as figuras.

Para verificar se havia outro fator, além do déficit proteico da ração causando um quadro de desnutrição, foi verificado o índice de ingesta, visando uma potencial redução do grupo desnutrido, o que ficou evidente e pode ser visto na figura 15, onde os ratos do grupo desnutrido apresentaram uma diferença significativa com os animais do grupo controle.



**Figura 15:** Índice de ingesta (g) de animais controle e desnutrido. Os valores representam as médias  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle.

## 5. DISCUSSÃO

Cientistas têm dedicado esforços no sentido de caracterizar o quadro de desnutrição, bem como os possíveis danos causados pelo comprometimento nutricional, havendo consenso que os eventos causados pelo déficit proteico durante a fase precoce do desenvolvimento são representados pelo comprometimento no peso e tamanho, bem como pela redução das concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais (Guedes, Melo e Teodósio, 2004).

Na década de 90, foi referendado que no início da fase pós-desmame ratos Wistar apresentam o peso médio de  $49,50 \pm 5,1$  g, fato que coincide com valor do peso do animais utilizados no início do estudo. Com relação ao peso, a literatura descreve que ratos Wistar ganham 5,5 vezes o peso até atingirem a idade adulta, neste íterim, foi observado que o grupo experimental alimentado com dieta normoproteica, apresentou ganho de peso 5 vezes maior do que o peso inicial, sendo similar ao descrito na literatura por Levitsky e Strupp, (1995).

Ao observamos o grupo que foi submetido a uma nutrição com dieta hipoproteica, foi verificado pequena variação no peso atingindo valores 1,1 vezes maiores após 45 dias do tratamento com este tipo de dieta se comparado aos animais com dieta normoproteica. Esse estudo corrobora com a literatura, onde já foi retratado que baixo peso acompanha o quadro de desnutrição, sendo esta uma das características principais desta patologia. (Zanin et al., 2003). Com a redução do suprimento de proteína, espera-se redução na quantidade de aminoácidos, que é fonte para a síntese hormonal,



sendo essencial no processo sintético de enzimas envolvidas diretamente no desenvolvimento ponderal e de crescimento (Neiva, Guerino e Mello, 1999).

No intuito de confirmar a implantação do quadro de desnutrição, foi avaliada a concentração plasmática de proteína total e albumina com proposto por Reid e Campbell (2004). Nesta avaliação foi verificado que os animais tratados com dieta hipoproteica, apresentaram baixas concentrações atingindo valores 31% menores na concentração plasmática de proteínas totais e 37,5% na concentração plasmática de albumina, caracterizando assim, o quadro de desnutrição.

Caber ressaltar que, no grupo submetido a recuperação nutricional, foi observado reestabelecimento das concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina, sendo indicativo da recuperação das condições orgânicas e corroborando com o estudo de Neiva et al (1999).

Um ponto a se considerar, é que a desnutrição possa promover alterações estruturais e funcionais em diversos órgãos, com destaque ao epitélio intestinal, onde pode haver comprometimento no processo digestivo, dificultando a absorção de nutrientes e indiretamente comprometendo o desenvolvimento e composição corporal. (Galdino et al., 2001; Souza, 2006; Natali et al., 2005, Moreira et al., 2008).

Um trabalho realizado com humanos em 2000, descreveu baixo peso em crianças do terceiro mundo acompanhado de comprometimento no crescimento e associou o achado ao quadro de desnutrição (Gopalan, 2000).

De forma consensual, tem sido demonstrado quadros de alterações nutricionais e suas relações com os desajustes metabólicos convergindo para

mudanças nas dinâmicas secretórias da insulina, bem como na sensibilidade tecidual ao hormônio (Filiputti et al., 2008). Nosso estudo mostra que, frente a desnutrição houve redução no processo secretório da insulina, induzida pela glicose, condição que perdurou mesmo após a recuperação nutricional atingir o máximo.

Os dados aqui apresentados acompanham estudos que descrevem a hipótese do “*Thrifty phenotype*” onde mudanças ligadas a fatores ambientais e nutricionais, que possam ter ocorrido nas fases iniciais da vida, podem promover alterações funcionais no pâncreas, assim, explicando as alterações observadas nos testes de tolerância a glicose e acrescentando ao fato de não observarmos reversibilidade do quadro, após recuperação nutricional, assim há de se considerar que as alterações podem ser permanentes e pouco reversíveis (Hales e Barker, 1992; Fernandez-Twinn et al., 2003; Heywood et al., 2004).

Uma possível explicação para a não recuperação nas dinâmicas insulínicas se deve as múltiplas alterações que a desnutrição provoca nas ilhotas pancreáticas representado por redução no volume das ilhotas, perda de granulação e atrofia das células, alteração na cinética secretória, menor vascularização nas ilhotas, redução no conteúdo de insulina ( Cherif et al., 2001)

Ao compararmos os dados do teste de tolerância a insulina com a literatura foi verificado que a sensibilidade tecidual a insulina mostrou-se reduzida na desnutrição e na recuperação nutricional, sendo sugestivo que o quadro de insulinopenia é acompanhado de resistência à insulina, eventos que

não retornam aos índices de normalidade, após a recuperação nutricional, como sugerido por Delghingaro- Augusto et al. (2004).

Acompanhando a proposta, passou-se a avaliar os eventos promovidos pela imobilização sobre as reservas glicogênicas musculares, destacando que esta reserva é marcadora das condições energéticas e da performance do músculo esquelético. Os resultados obtidos no grupo controle imobilizado mostraram redução significativa nas reservas de glicogênio, e se baseia no fato da imobilização ser uma condição que promove redução na população dos receptores insulínicos, comprometendo a cascata sinalizadora da insulina principalmente sobre às vias citosólicas reguladoras da síntese de glicogênio, predispondo ao quadro de resistência à insulina e concomitante redução nas reservas glicogênicas (Hirose et al., 2000).

Concomitante ao progresso da ciência e desenvolvimento de novas técnicas experimentais, tem sido profícuo o conhecimento dos eventos induzidos pela imobilização, de forma que é consenso entre diferentes cientistas que as principais alterações morfofuncionais estão totalmente configuradas no período de 7 dias pós-imobilização (Durigan, 2005; Durigan et al., 2006, Menon et al., 2007).

Segundo Jarvinem (1992), a fraqueza muscular também faz parte dos eventos decorrentes da imobilização e se deve a depleção da disponibilidade de creatina quinase, redução de sarcômeros em série, redução da força e da resistência à fadiga decorrente da atrofia das fibras I e II e diminuição da função aeróbia.

Filiputti (2008) estudando ratos desnutridos descreveu que não há mudança quanto as reservas de glicogênio, por outro lado, Delghingaro (2004), sugeriu que a desnutrição promove comprometimento nas funções pancreáticas modificando o perfil secretório da insulina e indiretamente promove redução nas reservas glicogênicas.

No presente estudo verificou-se no grupo desnutrido redução significativa nas reservas glicogênicas musculares, concordando com estudos de cunho quimiometabólico que avaliaram o status metabólico de músculos esqueléticos de animais desnutridos e apontaram para menores reservas energéticas indicando comprometimento na maturação das vias metabólicas (Okitolonda et al., 1987, Latorraca, 1998; Almeida, 2004; Bortolini, 2005; Alves, 2005).

No que se refere a imobilização, é consenso que a imobilização propicia diminuição no conteúdo muscular de glicogênio e redução na sensibilidade tecidual insulínica reduzindo a eficiência dos processos responsáveis pelo controle da captação de glicose, metabolização ou síntese de glicogênio, sendo uma resposta do organismo para um menor uso de energia, visto que o músculo não está sendo utilizado (Henriksen, 1996).

Ao aplicarmos a mesma análise, agora na fase de remobilização, ou seja, sete dias após a retirada da órtese, foi verificado recuperação das reservas energéticas, no entanto, estas não retomam a valores similares ao controle. A recuperação observada possivelmente se deva ao retorno do estímulo promovido pela deambulação do animal na caixa e concomitante

aumento na contração muscular e recuperação de funções ligadas a homeostasia metabólica das fibras (Bottinelli e Reggiani, 2000).

Na análise do conteúdo glicogênico muscular realizada no grupo recuperado após desnutrição, foi verificado menores reservas indicando que devido a restrição proteica houve comprometimento nas dinâmicas das vias enzimáticas que participam da formação de reservas energéticas. Neste sentido, a literatura tem demonstrado múltiplas modificações que acompanham os desajustes das vias sinalizadoras, destacando mudança na função mitocondrial, onde frente a desnutrição há diminuição da atividade oxidativa limitando a refosforilação do ADP para ATP, inibindo a função mitocondrial e restringindo a relação síntese/degradação de glicogênio, uma vez que as enzimas da via glicogênica necessitam da presença do ATP. Foi descrito que animais jovens submetidos à desnutrição e à posterior recuperação nutricional mantêm o agravo prévio de ultra-estrutura de mitocôndrias e mantêm a limitação da refosforilação do ADP. Esse fato indica persistência da disfunção mitocondrial, apesar da recuperação nutricional (Waterlow, 1960).

Quando os ratos recuperados foram submetidos à imobilização, também foi verificado redução nas reservas, no entanto, em porcentagem menor se comparado ao controle imobilizado. Uma possível explicação para este fato, pode ter relação com o perfil energético no qual o músculo se encontrava, ou seja, em decorrência das condições nutricionais já havia um déficit energético. Por sua vez, na fase de remobilização, estes músculos também não conseguiram retomar um padrão similar as condições iniciais.

A literatura destaca que a desnutrição promove diminuição na expressão das enzimas fosfofrutoquinase, succinato desidrogenase, enzimas da via glicolítica, enzimas da via insulínica, além de alterar a funcionalidade mitocondrial. Possivelmente, ao afetar este conjunto de ações a recuperação seja dificultada (Matecki et al., 2002).

A mesma linha de raciocínio se aplica ao peso e a relação proteína total/DNA do sóleo, onde se observam variações que acompanham o padrão descrito para as reservas glicogênicas, apresentando redução frente a recuperação nutricional e imobilização seguido de déficit na recuperação inserida na fase da remobilização. Este fato novamente retrata o comprometimento nas vias sinalizadoras, uma vez que, existe forte relação entre as dinâmicas de geração de energia representada pela enzima AMPK, a qual é comprometida tanto pela desnutrição quanto pela imobilização e a enzima mTOR, responsável pelo anabolismo, a qual também segue o perfil já descrito, os dados indicam que a multifatorialidade de alterações geradas pela desnutrição perduram mesmo após a recuperação nutricional.

Avaliações histológicas caracterizando as fibras musculares susceptíveis a agravos nutricionais tem mostrado grande identidade entre humanos e ratos (Goodman et al., 1981). Após evidenciar as alterações quimiometabólicas nos animais submetidos à recuperação nutricional, optou-se por realizar uma análise histológica para avaliar a área do músculo sóleo dos ratos.

Na literatura, está descrito que músculos antigravitacionários são os que possuem maior proporção de fibras lentas, apresentando maior susceptibilidade à atrofia induzida pelo desuso (Appell, 1990; Heslinga et al.,

1995; Ploug et al., 1995; Mercier et al., 1999; Herrera et al., 2001; Lieber, 2002; Tanaka et al., 2004). Frente a descrição apresentada, o músculo sóleo que apresenta predominância de fibras do tipo I, foi escolhido para a análise histológica.

A posição e o tempo da imobilização, também pode influenciar nas repostas diante o desuso muscular. Quando realizada na posição de encurtamento, acarreta na redução da massa muscular, da área das fibras, diminuição no número dos sarcômeros em série e maior proliferação do tecido conjuntivo. Já quando realizada em alongamento, leva ao aumento da massa muscular, aumento da síntese proteica, adição de sarcômeros em série e menor proliferação do tecido conjuntivo (Williams e Golspink, 1978; Tardieu et al., 1982; Fournier et al., 1983; Williams e Golspink, 1984; Appell, 1986; Józsa et al., 1988; Williams et al. 1988; Savolainem et al., 1988; Jarvinem et al., 1992; Yang et al., 1997).

Quanto ao tempo de imobilização, a literatura mostra que a maioria das mudanças, ocorrem nos primeiros sete dias de desuso muscular, período que foi selecionado neste estudo. (Booth, 1977; Williams e Goldspink, 1984; Thomason et al., 1997; Józsa et al., 1988; Okita et al., 2004

Com relação a área da fibra, a literatura mostra que pode variar de 2084 a  $3500\mu\text{m}^2$  (Delp e Duan, 1996; Coutinho et al., 2002; Gomes et al., 2004), e no estudo, observamos que os ratos controle apresentavam a média da área de  $2585 \pm 332\mu\text{m}^2$ , corroborando com a literatura. Os ratos que passaram por desnutrição e foram recuperados nutricionalmente, apresentaram uma área

com diferença significativa quando comparado ao controle de  $2086 \pm 168\mu\text{m}^2$ , porém, ainda dentro dos padrões de normalidade encontrado na literatura.

Na análise dos animais que passaram pela imobilização, foi observado grande diminuição da área, assim, no que se refere ao grupo tratado com dieta normoproteica o valor obtido foi de  $1341 \pm 151 \mu\text{m}^2$  enquanto o grupo tratado com dieta hipoproteica apresentou  $1741 \pm 168\mu\text{m}^2$  ou seja, independentemente do estado nutricional, a imobilização promoveu redução na área da fibra muscular. Os resultados acompanham as observações realizadas por Durigan (2006) utilizando músculos normais.

Em um estudo realizado com coelhos, imobilizados em encurtamento, avaliados do segundo ao sexto dia de imobilização verificou-se uma redução de 16% da área de secção transversa do músculo sóleo no segundo dia e uma redução de 17% no sexto dia (Smith et al., 2000). Kondo et al (1993) também verificou uma redução de 19% da massa muscular de sóleo em ratos imobilizados por 4 dias. Assim como Ahtikoski et al. (2003), que verificaram uma redução de 20% da massa do sóleo em encurtamento e 17% em alongamento em ratos imobilizados por 3 dias.

Essa diminuição da massa do músculo sóleo, assim como redução da área das fibras, ocorre devido um desequilíbrio entre a relação síntese e degradação proteica, já descrito no desuso muscular (Phillips et al., 2009).

No estudo feito por Booth e Sneider (1979) foi verificado redução da síntese proteica em 37% já nas primeiras 6 horas de imobilização, e nas primeiras 24 horas de suspensão, a redução atingiu 50% na síntese de proteínas do músculo sóleo de ratos (Taillandier et al., 2003).





## 6. CONCLUSÃO

A desnutrição infantil é uma doença grave, causando vários danos ao organismo do indivíduo, podendo deixar sequelas para a vida adulta.

Com o presente estudo, pode-se concluir que os ratos, após sofrerem desnutrição e passarem por uma recuperação nutricional, não conseguem retomar o tamanho e peso dos animais do grupo controle, mostrando que a desnutrição gera um atraso no desenvolvimento corporal.

Devido aos ratos serem menores, por conta do atraso no crescimento, a área dos músculos apresentaram também uma redução e o tecido conjuntivo se fez presente em uma maior região. Além do citado, houve resistência à insulina, e ainda uma menor concentração do glicogênio muscular.

O perfil metabólico de ratos recuperados de desnutrição, estabelecidos neste estudo, pode servir como base para trabalhos futuros, visando o comportamento dos mesmos frente à lesão músculo esquelética, imobilização e tratamento fisioterapêutico.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abrams RA, Tsai AN; Watson B, Jamali A, Lieber RL. Skeletal muscle recovery after tenotomy an seven day delayed muscle length restoration. Muscle Nerve. 2000; 23 (5): 707-714.

Adalbjornsson C. The effects of an interactive tracking skill intervention on infant's motor and cognitive skills. 2001. Auburn University.

Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in ratskeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. Acta Physiol Scand. abril de 2003; 177 (4) :473-81.

Almeida PBL, Mello MAR. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. Rev. Bras. Educ. Fís. Esp. 2004; 18 (1): 17-30.

Alves CR, Voltarelli FA, Mello AR. Spirulina como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. Revista Digital – Buenos Aires. 2005; 10 (86): 1-6.

Appell HJ, Skeletal muscle atrophy during immobilization. Int J Sports Med., 1986; v.7, p. 1-5.

Appell HJ, Muscular atrophy following immobilization. Sports Med., 1990; v.7, p. 42-58.

Badaloo A, Forrester T, Morlese JF, Heird WC, Jahoor F. The acute-phase protein response to infection in edematous and nonedematous protein-energy malnutrition. Am J Clin Nutr. 2002; 76 (6):1409-1415.

Barac.Nieto M, Spurr GB, Maksud MG, Lotero H. Aerobic work capacity in chronically undernourished adults males. *J. Appl.* 1978; 44: 209-215.

Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.* 1999; 31 (Suppl 1): 3-6.

Barreto RR, Franco ED, Brasileiro CF, Oliveira AP, Dimech GS, Malta DJ, Cazuzu JS, Leite AC, Silva TG, Maia MB. Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 17: 72 -76.

Bodine SC. Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(10):2200-8

Booth FW. Time course of muscular atrophy during immobilizations of hindlimb in rats. *J Appl Physiol Respir Ambiente Exerc Physiol.* 1977; 43 (4):656-61.

Booth FW , Seider MJ . Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol Respir Ambiente Exerc Physiol.* 1979 de novembro; 47 (5) :974-7.

Bortolini ACM. Efeito de diferentes modelos de desnutrição sobre parâmetros bioquímicos hepáticos plasmáticos e cerebelares de ratos de 21 dias. Dissertação de mestrado. UFRGS, 2005, 76p.

Bottinelli R and Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 195-262, 2000.

Cherif, H., Reusens, B., Dahri, S., Remacle, C. A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J. Nutr.* 2001; 131: 1555-9

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowshi TG, Ruderman NB. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and Messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol.*1992; 131(4): 1821-1825, 1992.

Coutinho JG, Gentil PC, Toral N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. *Cad Saúde Pública.* 2008; 24 (Suppl 2): S332-40.

Coutinho EL, Deluca C, Salvini TF. Bouts of Passive Stretching after Immobilization of the Rat Soleus Muscle Increase Collagen Macromolecular Organization and Muscle Fiber Area. *Connective Tissue Research.* 2006; 47: 278–286.

Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35 (11):1329-32.

Delghingaro- Augusto, V.,Ferreira, F., Bordin, S., Do Amaral M.E., Toyama, M.H., Boscherio, A.C., Carneiro, E.M., A low protein diets alter gene expression in rat pancreatic islets. *J Nutr.* 2004; 134: 321-327.

Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.* 1996; 80 (1): 261-70.

Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CL, Verdijk LB, van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol (Oxf).* 2013; 20.

Dobbing J, Smart JL. Vulnerability of development brain and behavior. *British Medical Bulletin.* 1974; 30: 164-168.

D'ovídio R. Avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em escolares de primeira série e sua relação com o estado nutricional. Monografia, conclusão de curso. AENE, 2007, 100p.

Durigan JLD, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação. *Fisio Mov.* 2005; 18(4): 53-63.

Durigan JLQ, Kalil CND, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análises metabólicas e morfométricas. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo.* 2006; 13 (2): 31-37.

Falcao-Tebas F, Bento-Santos A. Maternal low protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr.* 2012; 107(3):372-377.

Fernandez-Twinn, D.S., Ozanne, S.E, Ekizoglou, S., Doherty, C., James, L., Gusterson, B., Hales, C.N., The maternal endocrine environment in the low protein model of intra-uterine growth restriction. *British Journal of Nutrition,* 2003; 815-822.

Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC, Carneiro EM. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. 2008; *Life Sci* 82, 542-548.

Galdino R, Mello MAR, Almeida RL, Almeida CCS. Desnutrição protéico-calórica. In: Dâmaso A, editor. *Nutrição e exercício na prevenção de doenças.* São Paulo: Medsi, 2001; 225 – 275.

Gigante DP, Buchweitz M, Helbig E, Almeida AS, Araújo CL, Neumann NA, Victora C. Ensaio randomizado sobre o impacto da multimistura no estado

nutricional de crianças atendidas em escolas de educação infantil. *Jornal de Pediatria*. 2007; 83 (4): 104-106.

Gluckman PD, Hanson MA, Pinal, C. The developmental origins of adult disease. *Matern child nutr*. 2005; 1(3): 130-41.

Golden MH. Evolution of nutritional management of acute malnutrition. *IndianPediatr*. 2010; 47(8): 667-78.

Gopalan, S. Malnutrition: causes, consequences, and solutions. *Nutrition*. 2000; 16; 7-8

Gomes AR, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(10):1473-80. Epub 2004 Sep 22.

Goodman MN, Mceleney MA, Ruderma NB. Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. *Am J Physiol* 1981; 241:E321-7.

Guardiola A, Egewarth C, Rotta NT. Avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em escolares de primeira série e sua relação com o estado nutricional. *Jornal de Pediatria*. 2001; 77: 189-196.

Guedes RCA, melo APR, Teodósio NR. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. 2004.

Hales CN, Barker, DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabete mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 595-601.

Henriksen EJ, Holloszy JO. Effect of diffusion distance on measurement of rat skeletal muscle glucose transport in vitro. *Acta Physiol Scand.* 1991; 143 (4): 381-6.

Henriksen EJ, Stump CS, Trinh TH, Beaty SDJ. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. *Appl Physiol* 1996 May;80(5):1540-6.

Heslinga JW, Kronnie G, Huijing PA. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995; 70 (1): p.49-57.

Heywood W.E., Mian, N., Milla, P.J. Programming of defective rat pancreatic  $\beta$ -cell function in offspring from mothers fed a low protein diet during gestation and the suckling periods. *Clinical Science.* 2004; 107: 37-45.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depress insulin signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 2000; 279(6): E1235-41.

Huber U, Rosli A, Ballmer PE, Rippin SJ. The use of scores in general medicine. *The Umsch.* 2013; 70(10): 559-66

Issler RMS, Giugliani ERJ, Kreutz GT, Menezes CF, Justo EB, Kreutz VM, Pires M. Poverty Levels and children's health status: study of risk factors in a urban population of low socioeconomic level. *Revista de Saúde Pública.* 1996; 30(6): 506-11.

Jahoor F, Badaloo AV, Forrester T, Reid M, Jahoor F. Lipid kinetic differences between children with kwashiorkor and those with marasmus. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83 (6): 1283-8.



Jakubiec-Puka, A. Changes in myosin and actin filaments in fast skeletal muscle after denervation and self-reinnervation. *Comp BiochemPhysiol Comp Physiol*. 1992; 102 (1): 93-8.

Jarvinen M, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992; 73: 253-257.

Józsa L, Thoring J, Jarvinen M, Kannus P, Lehto M, Kvist M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol*. 1988;48: 267-278.

Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg Br*. 1990; 72 (2): 293-7.

Kannus P, Jozsa L, Järvinen TA, Järvinen TL, Kvist M, Natri A, Järvinen M. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J*. 1998; 30 (11): 799-810.

Kondo H , I Nakagaki , Sasaki S , Hori S , Y Itokawa. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*. 1993; 265 E839-44.

Latorraca MQ. Descrição de dieta purificada para indução de quadro de desnutrição protéica em ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 1998; 4(1): 9-12.

Levitasky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J. Nutr. Bethesda*. 1995; 125: 2212-2220.

Lieber RL, Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia. 2002;

Mandarim De Lacerda CA. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. Editora Humana Press; 2010.

Matecki s, Py G, Lambert K, Peyreigne C, Mercier J, Prefaut c, Ramonatxo M. Effect of prolonged undernutrition on rat diaphragm mitochondrial respiration. AM. J. Respir. Cell Mol Biol. 2002, 26: 239 -245.

Menon T, Casarolli LM, Cunha NB, Souza L, Andrade PHM, Albuquerque CE, Bertolini GRF. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos . Rev Bras Med Esporte, 2007, 13 (6): 407- 410.

Mercier C, Jobin J, Lepine C, Simard C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. Mech Ageing Dev. 1999; 106: 305-320.

Miranda LP, Resegue R, Figueiras ACM. A criança e o adolescente com problemas do desenvolvimento no ambulatório de pediatria. J Pediatria. 2003; 12, 34-35.

Monte CMG, Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. Jornal de Pediatria. 2000; 76 (supll 3), 285-297.

Moreira NM, Hermes C, Almeida CSL, Santana EC, Sant'ana DMG, Aaraújo EJA. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. Arq Neuropsiquiatr 2008; 66(2-A): 242-245.

Nascimento AB, Rezende D, Furlan AC, Marques LM. Efeitos da desnutrição protéico-calórica sobre a atividade exploratória de ratos em um teste de neofobia. *Semina*. 1991; 11(2): 92-96.

Natali MRM, Molinari SL, Valentini LC, Hubner M. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell*, 2005; 29 (1); 39 – 46.

Neiva CM, Guerino MR, Mello MAR. Análise dos efeitos da desnutrição protéico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single session) parâmetros metabólicos. *Motriz*.1999; 1 (1): 32-43.

Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. *J músculo Res. celular Motil*. 2004, 25 (2) :159-66.

Orozco-Solis R, Matos RJ, et al., Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Nutrition*. 2009; 96(3): 481-92.

Okitolonda W, Brichard SM, Henquin JC. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia*.1987; 30(12): 946-51.

Phillips, SM, Glover, EI, Rennie, MJ, Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 107:645-654, 2009.

Plagemann A, Waas T, Harder T, et al. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Nutrition*. 2000; 34(1): 1-6.

Ploug T, Ohkuma T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995; v.268, p. 980-986

Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 85 (5):536-45.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976; 295(7): 349-53.

Reid CL, Campbell IT. Metabolic Physiology. *Current Anaesthesia.* 2004; 15: 209-217.

Savolainen J, K Väänänen , Puranen J , Takala TE , Komulainen J , Vihko V. Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscles: effect of cast-immobilization in the lengthened and shortened positions. *Arch Phys Med Rehabil.* 1988; 69 (11):964-9.

Schafer AA, Dallaze A, Meller FO, Vicari IA, Buschweitz MD, Helbig E. Alterações físicas em ratos da CEPA submetidos em a dietas com e sem proteínas. Monografia, 2008.

Siu LO, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology.* 1970; 7: 13-19.

Silva VC, Almeida SS. Desnutrição proteica no início da vida prejudica a memória social em ratos adultos. *Rev. Nutri.* 2006; 19 (2): 195 -201.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.2006; 39: 979-85.

Smart JL. Malnutrition, learning and behavior: 25 years on from the MIT symposium. *Proceedings of the nutrition society*. 1993; 52: 189-199.

Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alteration in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res*, 2000; v. 302, p. 235-241

Souza AS. Conseqüências da Desnutrição na Distribuição Relativa de Ácidos Graxos de Cadeia Longa do Sistema Nervoso Central e no Comportamento Cognitivo de Ratos. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-graduação em Nutrição. - UFRJ, 2006. 137f.

Taillandier D , Aurousseau E , Combaret L , Guezennec CY , Attaix D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *Int J Biol Biochem Celular*. 2003, 35 (5) :665-75.

Tanaka T, Kariya Y, Y Hoshino. Histoquímica estudo sobre as alterações na musculares fibras em relação aos efeitos de envelhecimento em recuperação de muscular atrofia causado por desuso em ratos. *J Orthop Sei*. 2004; 9 (1) :76-85.

Tardieu C, Tabary JC, Tabary C, Tardieu L. Adaptation of connective tissue length to immobilization in the lengthened and shortened positions in cat soleus muscle. *J Physiol (Paris)*. 1982; 78 (2):214-20.

Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hind limb unweighting. *J Appl Physiol*. 1990; 68 (1):1-12.

Truswell AS. Protein versus energy in protein energy malnutrition. *South African Med.* 1981; 59: 753-756.

Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, van Loon LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013; 30: 1011-1120.

Waterlow JC, Alleyne GAO. Má nutrição protéica em crianças: Evolução dos conhecimentos nos últimos dez anos. São Paulo, Pancast, 1974; p 120.

Waterlow JC, Cravieto J, Stephen JML. Protein malnutrition in man. *Adv. Prot. Chem.* Academic Press Inc. 1960; 131-238.

Waterlow JC, Cravieto J, Stephen JML. Protein malnutrition in man. *Adv. Prot. Chem.* Academic Press Inc. 1960; 131-238.

Wauben IP, Wainwright PE. The influence of neonatal nutrition on behavioral development: a critical appraisal. *Nutr Rev.* 1999; 57(2): 35-44.

Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomerelength and physiologicalproperties in immobilized muscle. *J Anat* 1978; 127 (Pt 3):459-68.

Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984; v.138: p. 343-50

Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractileactivity in the prevention of connectivetissueaccumulation in muscle. *J Anat.* 1.988; 158:109-14.

Wilson SJ, Ross JJ, Harris AJ. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development.* 1988; 102(4): 815-21.

Yang H, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink L. Variações no tipo de fibra muscular, a massa muscular e a expressão do gene IGF-I no músculo esquelético do coelho submetido a estiramento. J Anat. 1997; 190 (Pt 4): 613-22.

Zanin STM, Molinari SL, Sant'Anal DMG, Neto MHM. NADH-diaphorase positive neurons of the jejunum of disnurtured adult rats (*Rattus norvegicus*): quantitative aspects. 2003; Arq. Neuro-Psiquiatr. 61 no.3A.