

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 800 milhões de pessoas no mundo apresentam algum tipo de desnutrição, sendo a desnutrição protéico-calórica o tipo mais comum (Waterlow, 1996), que afeta principalmente as crianças de países não desenvolvidos, as quais apresentam redução de peso e altura quando comparadas a crianças saudáveis, de acordo com os padrões da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tomkins, 2000; Golden, 2002).

No Brasil, estudos recentes tem apontado o nível de insegurança alimentar, onde cerca de 40,1 milhões de pessoas convivem com a forma leve de insegurança alimentar (20,9% da população total); 14,3 milhões estão na situação moderada e 11,2 milhões de pessoas passam pela privação de alimentos, e insegurança alimentar grave (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2010).

A desnutrição é uma das principais causas de mortalidade infantil no Brasil, e é definida, segundo a OMS, como uma variedade de condições patológicas decorrentes das deficiências de carboidratos e proteínas em proporções variadas. É uma doença multifatorial cujas raízes se encontram na pobreza. Pode iniciar precocemente na fase intra-uterina ou no início da infância, cuja principal causa é a interrupção do aleitamento materno antes do previsto (*United Nations Administrative Committee on Coordination / SubCommittee on Nutrition- ACC/SCN e Food Policy Research Institute - IFPRI, 2000*).

Algumas outras condições, além da dieta deficitária, podem acarretar em desnutrição, como a má absorção intestinal, perda anormal de nutrientes por meio de diarreia, hemorragia, insuficiência renal ou sudorese excessiva (Schiesser et al., 2008).

Issler et al. (1996) relatam que crianças de famílias com extrema baixa renda apresentam menor peso ao nascimento, maiores taxas de mortalidade, internações hospitalares e, principalmente, maiores índices de desnutrição. O estudo de Guardiola et al. (2001) mostrou que crianças matriculadas em escolas municipais apresentam mais frequentemente déficit de peso para altura quando comparadas com crianças das escolas particulares. Além disso, Issler et al. (1996) apontam que os efeitos da desnutrição são negativos por toda a vida do indivíduo; cerca de 20% dos desnutridos atingem a vida adulta com uma estatura inferior ao esperado e ainda quando inseridos no mercado de trabalho apresentam limitações no desenvolvimento e desempenho de tarefas e, por isso, menores salários.

A desnutrição é classificada em três níveis, segundo Gomez (1946): Primeiro grau, na qual o déficit de peso é superior a 10% da média considerada normal; a de segundo grau, na qual o déficit de peso é superior a 25% e a de terceiro grau, na qual o déficit de peso é superior a 40%. A desnutrição de terceiro grau é a mais grave e pode ser subdividida em outras duas categorias. A primeira é o marasmo, caracterizado pela perda de tecido muscular e adiposo, com diminuição de 60% do peso corporal esperada pela idade (Truswell, 1981); a segunda é Kwashiorkor, caracterizada pela perda do tecido muscular, porém o tecido adiposo é preservado (Waterlow, 1984). As características clínicas podem

ser: edema, dermatose, alterações dos cabelos e hepatomegalia (Marcondes, 1986).

A glicemia pode apresentar valores normais ou reduzidos em crianças que apresentam marasmo ou Kwashiorkor (Waterlow e Alleyne, 1974). As proteínas plasmáticas são marcadoras da desnutrição, já que estão diretamente relacionadas com a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica (Reid e Campbell, 2004).

O termo desnutrição implica que um ou mais nutrientes essenciais está ausente da alimentação ou presente, porém em proporções inadequadas. Embora a falta de vitaminas e minerais possa afetar a maturação do cérebro, a falta de proteínas parece ser o mais crítico (Morgane, 2002).

Na literatura, destaca-se a desnutrição proteica (DP), onde a concentração de proteínas plasmáticas é marcadora da desnutrição (Reid e Campbell, 2004). A proteína é um nutriente de grande importância e as principais funções estão relacionadas com a formação de enzimas, anticorpos, hormônios, equilíbrio ácido-básico, transporte de oxigênio, coagulação do sangue e atividade muscular (Neiva et al., 1999).

As proteínas adquiridas durante a alimentação são uma fonte importante de aminoácidos essenciais para o bom funcionamento do organismo e podem servir como antioxidante intracelular. Portanto, a restrição pode levar a um aumento de danos oxidativos por diminuir as defesas antioxidantes de tecidos (Bonatto et al., 2005).

A DP imposta no início da vida (desnutrição posnatal) produz alterações no cérebro, incluindo as neurofisiológicas (Lukoyanov e Andrade, 2000; Fukuda et al., 2002), morfológicas (Díaz-Cintra et al., 1991; Debassio et al., 1996) e

neuroquímicas (Alamy et al., 2005) e parece afetar o desenvolvimento do encéfalo, interferindo com o nascimento de novas células, migração e diferenciação celular, mielinização e formação de sinapses (Debassio et al., 1994; Lukoyanov e Andrade, 2000). Chopra et al. (1986) observaram em estudo que incluiu 43 crianças desnutridas, uma redução da velocidade de condução nervosa periférica, assim como um retardo na mielinização; desmielinização segmentar e espaço internodal menor.

Em condições de nutrição normal a captação e utilização de nutrientes pelo organismo estão em equilíbrio, assegurando, desta forma, o metabolismo celular adequado; crescimento, duplicação, maturação e fenômenos que influenciam todas as fases do desenvolvimento, desde a gestação até a fase adulta (Alves et al., 2008).

Uma alimentação que não supre as necessidades de proteínas e calorias, provocando alterações em todo o metabolismo na criança e o organismo cria mecanismos eficientes para economizar energia, evitando assim risco para a sobrevivência, diminuindo a velocidade de crescimento e, em alguns casos extremos, anulando-o completamente (Moysés e Lima, 1983).

Foi demonstrado que, em sala de aula, a criança desnutrida apresenta dificuldade de concentração, de coordenação motora, dificuldade para aquisição e formulação do aprendizado, ou seja, a fome reduz de uma forma geral o rendimento do aluno na escola (Frota et al., 2009). Além disso, é possível que a fome cause modificações comportamentais, tais como alterações emocionais, de motivação e ansiedade. Ocorrem também alterações intelectuais que prejudicam definitivamente o aprendizado e memória, podendo a criança apresentar um desenvolvimento inferior ao esperado para a idade (Levitasky e Strupp, 1995).

Em laboratório, algumas técnicas podem ser utilizadas para induzir a desnutrição em ratos; restrição protéico-calórica, aumento do número de filhotes na ninhada e restrição do período de amamentação dos filhotes. Morgane et al. (2002) relatam que estudos realizados com ratos submetidos a DP, reproduziu efeitos similares aos encontrados em alguns países subdesenvolvidos, incluindo alterações neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais.

Estudos realizados por Jahnke e Bedi (2007) demonstram que ratos submetidos à DP durante o desmame apresentaram uma redução do peso corporal de 50-73%. Nascimento et al. (1990) relatam que os ratos desnutridos apresentam redução do peso corporal em até 50% comparado com o rato nutrido, diminuição de pêlos, aumento da curvatura dorsal, são mais ativos e também agressivos.

O tecido muscular esquelético é um reservatório de proteína, por isso segundo Nascimento et al. (1990), quando há déficit protéico na dieta, o tecido é alvo de depleção, ou seja, diminuição. Algumas alterações foram observadas, como por exemplo, o diâmetro da fibra muscular foi reduzido, nestas fibras encontraram os espaços intercelulares alargados contendo vasos capilares e fibroblastos, escasso colágeno fibrilar e não houve aumento do colágeno intersticial e ainda estrutura miofibrilar e miofilamentar mantida.

Alterações hormonais também foram constatadas para manter a homeostasia energética através da glicose e lipólise aumentadas, maior mobilização de aminoácidos, preservação das proteínas viscerais, através da maior utilização das proteínas musculares, diminuição do armazenamento de glicogênio, gorduras e proteínas e diminuição do metabolismo (Sampaio, 2009).

A recuperação proteica pode reverter alguns déficits gerados pela desnutrição, como por exemplo: o peso corporal, peso cerebral e alterações sinápticas, enquanto que a redução no número de células, menor reatividade a medicamentos, alterações comportamentais como a hiperatividade e baixa interação social são irreversíveis mesmo após uma dieta adequada (Lukoyanov e Andrade, 2000; Hernandez et al., 2005; Camargo e Almeida, 2005; Souza et al., 2008).

Animais submetidos à desnutrição e posteriormente a reabilitação nutricional não apresentam diferença no peso cerebral, a diferença existe quando se compara animais desnutridos e nutridos. Outro achado importante é em relação ao peso corporal, a diferença é menor no grupo desnutrido mesmo após a reabilitação nutricional (Nunes et al., 2002).

O sistema nervoso periférico (SNP) apresenta uma boa capacidade regenerativa, porém, a recuperação funcional após lesão geralmente é prolongada e difícil. Atualmente, o homem tem sido cada vez mais exposto a esse tipo de lesão, considerando o aumento da violência urbana, acidentes de trânsito, acidentes domésticos e lesões em esportes de alta complexidade (Mendonça, Barbieri e Mazzer, 2003).

As lesões nervosas periféricas apresentam uma recuperação lenta, que depende da natureza, extensão e grau da lesão. Quanto mais precoce a reinervação, melhor é o prognóstico (Eberstein e Eberstein, 1996). Esse tipo de lesão causa uma diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade no território inervado, gerando diversas alterações histológicas, como por exemplo, a atrofia muscular e proliferação do tecido conjuntivo no músculo (Fernandes et al., 2005).

Seddon (1943), citado por Burnett e Zager (2004), estabeleceu uma classificação para as lesões nervosas periféricas, utilizando como critério o grau de comprometimento estrutural e o prognóstico de recuperação, qual seja: Neuropraxia (tipo I), caracterizada por um bloqueio localizado da condução nervosa, com leve comprometimento da bainha de mielina e preservação da continuidade axonal, sendo reversível em aproximadamente 30 dias, de forma espontânea; Axoniotmese (tipo II), considerada uma lesão grave, caracterizada por compressão ou esmagamento do nervo, com interrupção da continuidade axonal, estando os envoltórios conjuntivos e a microcirculação preservados, na qual se observa a presença de degeneração Walleriana e a regeneração axonal ocorre de forma processual; Neurotmese (tipo III), considerada a mais grave, caracterizada pela ruptura completa do nervo, com consequente descontinuidade entre o sistema nervoso central e a periferia, que exige reconstrução cirúrgica.

Em lesões caracterizadas como axoniotmese, alterações estruturais, bioquímicas, celulares e moleculares acontecem em toda a célula, no sentido de recuperar a função do nervo danificado (Burnett e Zager, 2004). Entre as alterações estão a cromatólise, o aumento de volume do corpo celular, a migração do núcleo para a periferia da célula e alterações metabólicas (Burnett e Zager, 2004). Quarenta e oito horas após a lesão não se evidenciam fibras nervosas normais, estando presente a desintegração do citoesqueleto axonal (Ferreira e Martinez, 2000).

O processo de regeneração é iniciado horas após a lesão. Os axônios da porção proximal à lesão formam os primeiros brotos ou neuritos nos locais correspondentes aos nodos de Ranvier, a chamada zona germinativa (Ferreira, 2001), de onde dois a três neuritos, mediados por fatores tróficos sintetizados

pelas células de Schwann, como a laminina e a fibronectina, seguem em direção ao órgão-alvo (Fawcett e Keynes, 1990; Ide, 1996).

A reinervação muscular após axoniotmese em ratos tem início aproximadamente 15 dias após a lesão, quando se observa a poliinervação. O período que corresponde ao pico de poliinervação é entre o 21º e o 25º dia. A partir do momento em que o contato sináptico é recuperado, a síntese de receptores extrajuncionais e a liberação de fatores tróficos pelo músculo é diminuída, iniciando-se a eliminação sináptica, na qual a extremidade dos neuritos regenerados se transforma em terminal nervoso (Carmignoto et al., 1983; Gorio et al., 1983) e os demais neuritos sofrem um processo de retração e degeneram (Sanes e Lichtman, 1999). A partir disso, as fibras musculares tornam-se monoinervadas (Gorio et al., 1983) e a função do músculo é recuperada.

O processo de regeneração nervosa e consequente reinervação muscular em animais desnutridos é pouco conhecido. Assim, considerando a literatura estudada, que aponta que a desnutrição proteica gera diversas alterações orgânicas que persistem por toda a vida, influenciando diretamente na qualidade de vida dos sujeitos e considerando que não foram identificados estudos que analisassem as características do nervo regenerado em animais desnutridos, nem tampouco em animais desnutridos e submetidos à recuperação nutricional, este estudo se propôs a testar a hipótese de que a desnutrição, mesmo quando os animais são recuperados com dieta normal, pode comprometer a regeneração nervosa e recuperação funcional após axoniotmese.

2 OBJETIVO

Realizar uma avaliação morfométrica e funcional do nervo isquiático de ratos submetidos à desnutrição e renutrição dietética, após axoniotmese.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP – Protocolo CEUA nº 01/12 (anexo 1).

3.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, recém-desmamados (21 dias), divididos aleatoriamente em 6 grupos, conforme representado na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos animais em grupos experimentais.

| Grupo | Sigla | Descrição | N |
|--------------------------------|--------------|--|----------|
| Controle Normal | CN | Animais sem lesão nervosa e com dieta normal | 5 |
| Controle Desnutrido | CD | Animais sem lesão nervosa e desnutridos | 7 |
| Controle Desnutrido Recuperado | CDR | Animais sem lesão nervosa, desnutridos e recuperados | 7 |
| Lesado Normal | LN | Animais com dieta normal e submetidos à lesão do nervo isquiático | 7 |
| Lesado Desnutrido | LD | Animais desnutridos e submetidos à lesão do nervo isquiático | 7 |
| Lesado Desnutrido Recuperado | LDR | Animais desnutridos e recuperados submetidos à lesão do nervo isquiático | 7 |

Todos os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 3 a 5 animais cada, recebendo água e alimentação *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6h00.

3.3 Procedimento para Desnutrição e Recuperação Nutricional

Durante o experimento foram empregadas dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) comercializadas 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

| Dieta AN 93 M -14% | | Dieta AN - 6% proteína | |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|---------------|
| (ingredientes para 1 Kg) | | (ingredientes para 1 Kg) | |
| Amido de milho | 465.700 | Amido de milho | 508.000 |
| Caseína | 140.000 | Caseína | 66.000 |
| 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 |
| TOTAL | 1000.0 | TOTAL | 1000.0 |

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey, (1993).

O grupo CN apenas recebeu a dieta normoproteica AN 93 (14% de proteína) durante 45 dias.

O grupo CD foi tratado com dieta hipoproteica (6% de proteína) por um período de 45 dias.

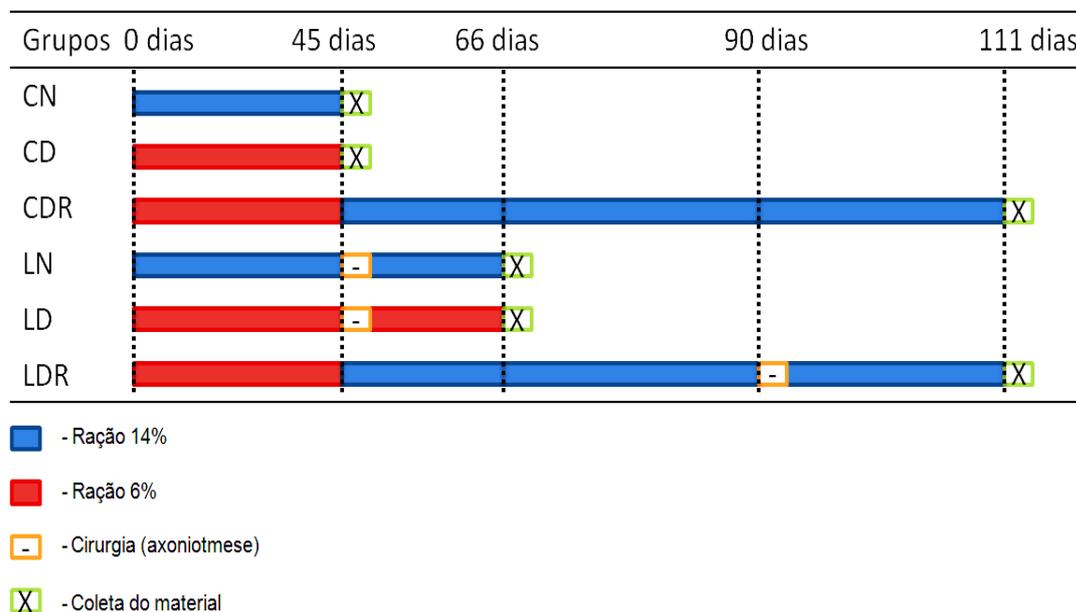
O grupo LN recebeu a dieta normoproteica AN93 (14% de proteína) por um período de 45 dias e, no 46º dia teve o nervo isquiático esquerdo esmagado, sendo acompanhado por 21 dias recebendo ração normoproteica.

O grupo LD foi tratado com dieta hipoproteica (6% de proteína) durante 45 dias e, no 46º dia, foi realizado o esmagamento do nervo isquiático. Os animais foram acompanhados por 21 dias, recebendo dieta hipoproteica.

Os grupos CDR e LDR foram tratados com dieta hipoproteica (6% de proteína) por 45 dias. Após este período foi iniciada a recuperação nutricional por meio da dieta AN 93-14% por mais 45 dias. No 91º dia o grupo LDR foi submetido ao esmagamento do nervo isquiático, sendo acompanhado por 21 dias, recebendo dieta normoproteica.

A tabela 3 resume os procedimentos para desnutrição, renutrição, lesão nervosa e coleta do nervo isquiático nos diferentes grupos estudados.

Tabela 3: Cronograma de desnutrição, renutrição, lesão nervosa e coleta do material nos animais dos grupos Controle Normal (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD), Controle Desnutrido Recuperado (CDR) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR).



3.4 Índice Funcional do Ciático (IFC)

Previamente, todos os animais foram treinados a caminhar na passarela de marcha, um corredor medindo 42 × 8,2 cm, que termina numa caixa com fraca luminosidade no interior (Figura 1-A), onde o animal procura se abrigar após o percurso (De Medinaceli et al., 1982; Bain, Mackinnon e Hunter, 1989). Após o treinamento, foi obtido o registro pré-operatório das impressões das pegadas, que constituem parâmetro inicial de avaliação, para comparação com os registros pós-operatórios no 7º, 14º e 21º dia.

Para obter as impressões das pegadas, a face plantar das patas posteriores dos animais foi pintada com tinta preta de impressão digital e, a seguir, os animais foram colocados para caminhar na passarela, deixando suas pegadas impressas em tiras de papel sulfite A4 branco, com a dimensão

adequada do corredor (De Medinaceli *et al.*, 1982; Varejão *et al.* 2004), conforme figura 1B.

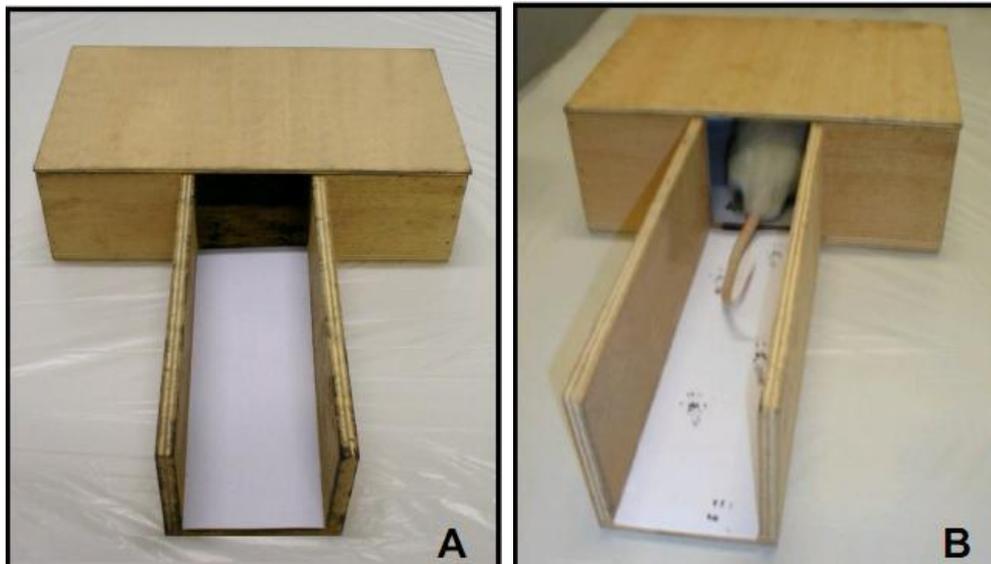


Figura 1. Aparato de análise da marcha (A); Registro das impressões plantares das patas normal e experimental do rato (B).

Para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) utilizou-se um paquímetro digital (MITUTOYO®), registrando-se a distância entre a extremidade do terceiro dedo e o calcâneo - Comprimento da Pegada (PL); a distância entre o primeiro e o quinto dedo - Largura da Pegada (TS) e a distância entre o segundo e quarto dedo - Largura Intermediária da Pegada (ITS) das patas experimental (E) e normal (N), como sugerido por Bain, Mackinnon e Hunter (1989) e Varejão *et al.* (2004), conforme pode ser visualizado na figura 2.

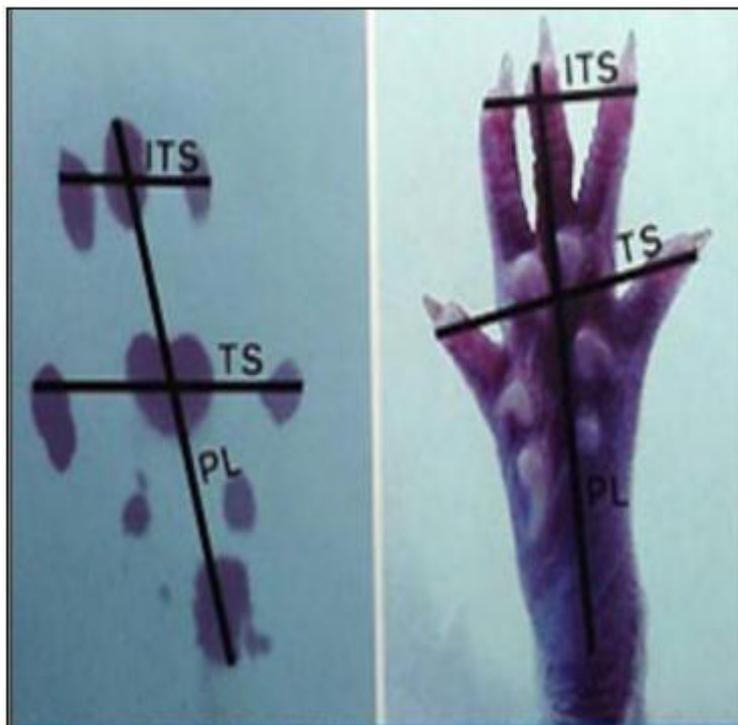


Figura 2. Parâmetros para mensuração das pegadas. PL: (Print Length); ITS: Intermediate Toes Spread; TS: Toe Spread. **Fonte:** Varejão et al. (2004).

A figura 3 mostra as características das pegadas dos animais utilizados neste estudo, nos diferentes períodos de análise, para o grupo LD.

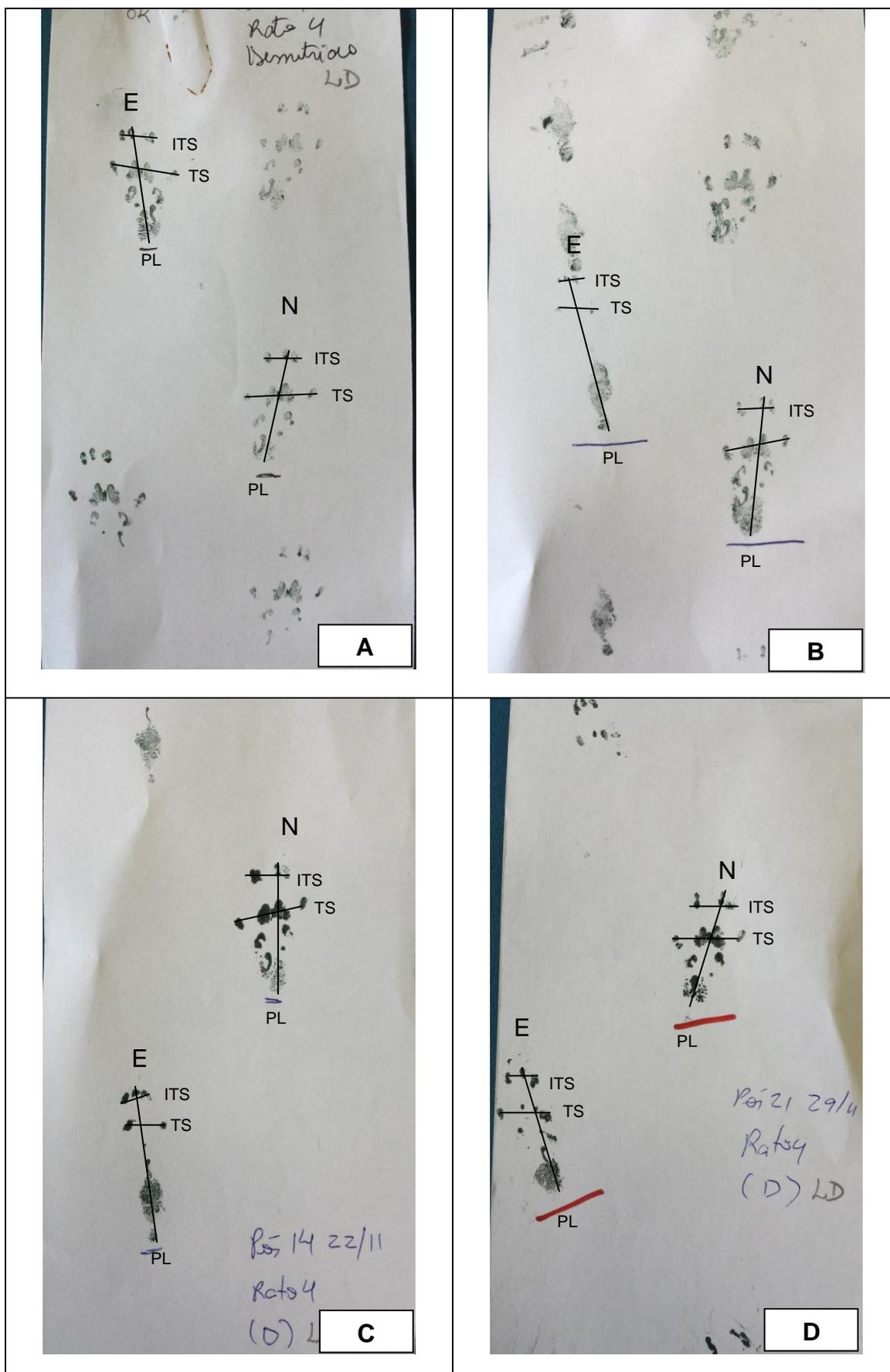


Figura 3: Imagem da impressão da pata normal (N) e experimental (E), no período pré-operatório (A), no 7º dia pós-operatório - PO (B), no 14º dia PO (C) e no 21º dia PO (D). Observar as variações nas distâncias (PL, IT, ITS), nos diferentes períodos de análise.

Os valores encontrados foram organizados na fórmula a seguir, definida por Bain, Mackinnon e Hunter (1989):

$$SFI = - 38.3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EITS-NITS)}{NITS} - 8.8$$

Os dados obtidos expressam a perda funcional em termos percentuais, sendo que valores entre 0 e -20 (zero e menos vinte) representam função normal ou ausência de disfunção e, entre -21 e -100 (menos vinte e um e menos cem), perda da função, sendo que, quanto mais próximo de -100 (menos cem), maior a disfunção (Bain, Mackinnon e Hunter; 1989).

3.5 Lesão Nervosa

Os animais dos grupos LN, LD e LDR foram submetidos à cirurgia para esmagamento do nervo isquiático, recebendo anestesia intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g de massa corporal e 0,06 mL/100 g de massa corporal, respectivamente.

Em seguida, foi realizada a tricotomia na região glútea esquerda e, com os animais posicionados em decúbito ventral, fez-se uma incisão de aproximadamente 2 cm sobre a pele da região glútea e os músculos foram divulsionados até a exposição do nervo isquiático. O nervo foi delicadamente separado do tecido conjuntivo adjacente e esmagado com uma pinça hemostática previamente preparada (figuras 4 e 5). Foram realizados quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles, de acordo com

Fernandes et al. (2005). O esmagamento foi realizado a uma distância de 5 mm proximal ao ponto de ramificação do nervo isquiático.

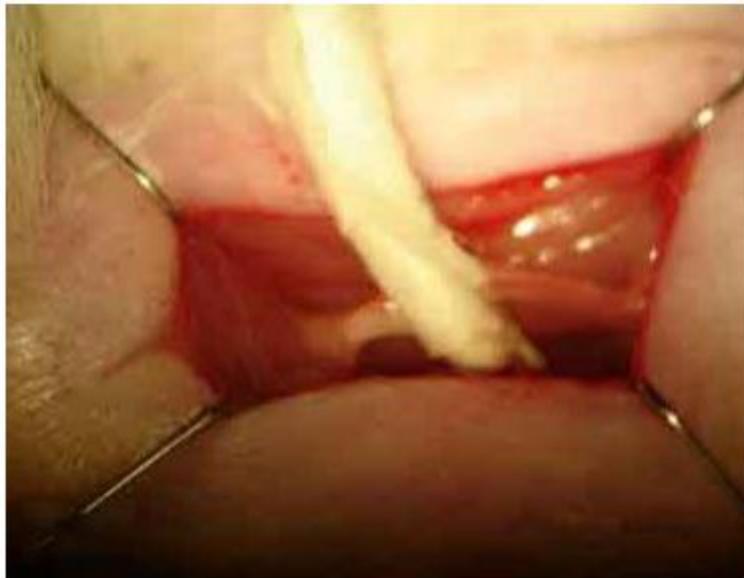


Figura 4: Método utilizado para lesão do nervo.



Figura 5: Aspecto macroscópico do nervo imediatamente após o esmagamento. Notar a presença de lesão axonal sem perda da continuidade dos envoltórios conjuntivos.

Ao término desse procedimento, os planos muscular e cutâneo foram fechados com fio de sutura Ethicon 6-0.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, submetidos a ciclo/escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água, durante 21 dias. Nos dois primeiros dias pós-operatórios os animais receberam 4 μ L de Dipirona Sódica (500 mg/mL) - via oral, com efeito analgésico.

3.6 Coleta do Material

Após 21 dias da lesão nervosa os animais foram novamente anestesiados conforme descrito para a lesão nervosa, o nervo isquiático esquerdo foi exposto e fixado *in situ* à 4°C, durante 10 minutos com fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.3. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os fragmentos do nervo isquiático dos animais dos 6 grupos foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.3, por duas horas, imersos em uranila 5% durante 24 horas, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Cortes transversais de 1 μ m foram obtidos em ultramicrótomo LKB e corados com Azul de Toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia de luz.

3.7 Análise Morfométrica do Nervo

A análise morfométrica foi realizada a partir dos cortes transversais da porção distal do nervo regenerado nos animais de todos os grupos, em microscópio de luz Olympus (BX 41- BF) acoplado a um sistema analisador de imagens que utiliza o *software* Image-Pro Plus 6.2 – Media Cybernetics®. A calibração do sistema de análise de imagens para obtenção de medidas na unidade de micrômetros (μm) foi realizada com o auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada ZEISS 5_{+100/100} mm.

Foi analisado um corte por animal em cada grupo, do qual foram obtidas imagens em objetiva de 10x, para a observação de todo o nervo e em objetiva de 100X, para a seleção dos campos para amostra. A amostra foi constituída de 5 campos aleatoriamente definidos em cada corte.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática, sendo que em cada fibra nervosa mielínica foram obtidos valores do diâmetro (μm) do axônio e da fibra nervosa (Figura 6). A partir desses dados, a espessura da bainha de mielina foi calculada.

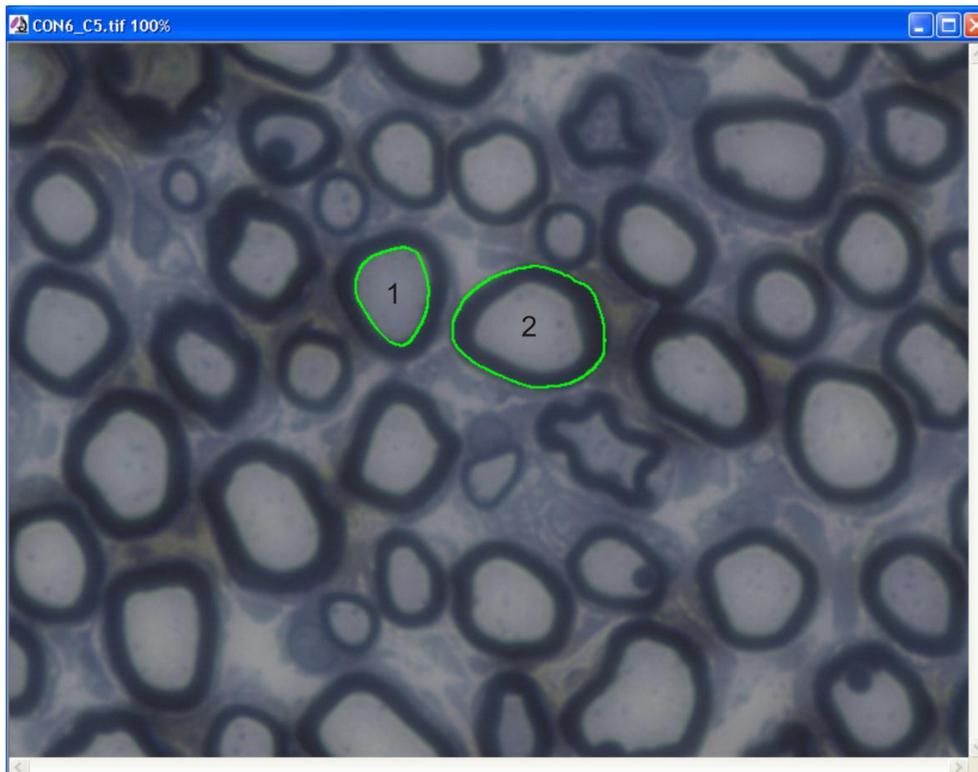


Figura 6: Interface do *software* Image Pro-Plus 6.2 – Media Cybernetics®, mostrando o procedimento utilizado para mensuração do diâmetro dos axônios (1) e das fibras nervosas (2). Aumento = 1000x

Os valores referentes à medida de cada axônio foram transferidos para o *Excel* e constituíram uma lista de dados.

O diâmetro médio dos axônios de cada nervo foi obtido a partir da somatória dos diâmetros dos axônios, dividido pelo número de axônios mensurados. O cálculo do diâmetro médio das fibras nervosas mielínicas seguiu a mesma lógica. Os valores de espessura das bainhas de mielina foram obtidos subtraindo-se o diâmetro do axônio do diâmetro da fibra e, em seguida, dividindo-se por dois. A espessura média das bainhas de mielina também foi obtida dividindo-se a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras nervosas analisadas.

O valor da razão G foi calculado pela divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

A seguir, são apresentadas as fórmulas utilizadas para calcular o diâmetro médio dos axônios, diâmetro médio das fibras, espessura média da bainha de mielina e razão G, respectivamente:

$$\text{Diâmetro médio axônios} = \frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{\text{N}^\circ \text{ axônios}}$$

$$\text{Diâmetro médio fibras} = \frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{\text{N}^\circ \text{ fibras}}$$

$$\text{Espessura da bainha mielina} = \frac{\text{diâmetro da fibra} - \text{diâmetro do axônio}}{2}$$

$$\text{Razão G} = \frac{\text{diâmetro do axônio (média)}}{\text{diâmetro da fibra (média)}}$$

3.8 Análise do número de axônios

O número total de axônios em cada nervo foi calculado a partir da somatória do número de axônios obtido nos 5 campos, em objetiva de 100X, sendo estabelecida uma proporção desse valor com a área total do nervo, obtida em objetiva de 10X.

$$\text{amostra (\%)} = \frac{\sum \text{área dos campos}}{\sum \text{área do nervo}} * 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de axônios} = \frac{\sum \text{N}^\circ \text{ axônios}}{\text{amostra (\%)}} * 100$$

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com uso do IBM® SPSS® (*software statistical package for the social sciences*) STATISTICS for windows versão 20.

Para análise morfométrica, a normalidade foi verificada através do teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade através do teste de Levene. Para as variáveis que atenderam as pressuposições de normalidade e homocedasticidade das variâncias, foram adotados métodos da estatística paramétrica: análise de variância ANOVA-F (um fator) seguido do teste de comparação múltipla de médias - teste de Tukey HSD e para as variáveis que não atenderam a pressuposição da homocedasticidade das variâncias, foi adotado o teste de Tamhane.

Para análise do IFC (intergrupos e intragrupo) foram utilizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk seguido do teste ANOVA-F (medidas repetidas para dois fatores) seguido do teste de Tukey para análise intergrupos e Bonferroni para análise intragrupos.

Para avaliação da massa corporal dos animais, foram utilizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido do teste t de Student para a comparação entre 2 grupos.

Assim, foram considerados significativos os parâmetros e/ou funções lineares de seus níveis, tais que $p \leq 0,05$.

Os dados foram apresentados por meio de média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal dos Animais

Os animais dos grupos CN e CD foram pesados no início do experimento e no 45° dia; os grupos LN e LD no início e no 66° dia do experimento e os grupos CDR e LDR no início e no 111° dia do experimento.

A massa corporal média dos animais de todos os grupos no início do experimento, ou seja, com 21 dias de vida, foi de $53,06 \pm 3,2$ g.

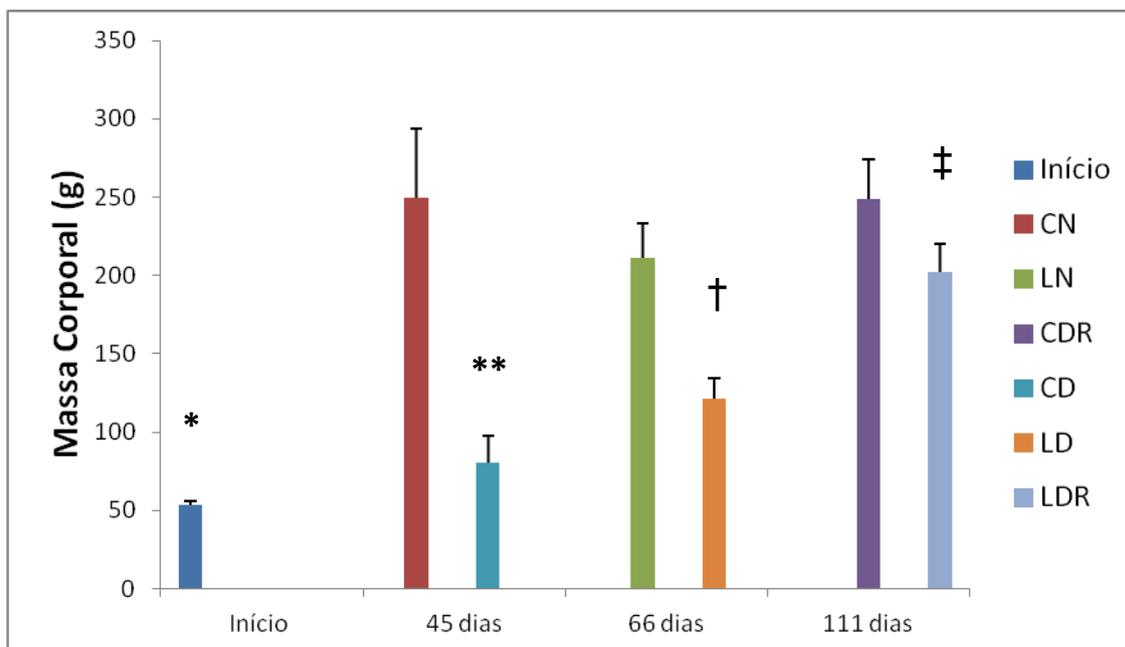


Figura 7: Valores médios \pm DP da massa corporal dos animais dos grupos Controle Normal (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD), Controle Desnutrido Recuperado (CDR) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR).

(*) Difere de todos os demais grupos; (**) Difere do grupo CN; (†) Difere do grupo LN e (‡) Difere do grupo CDR.

Os animais de todos os grupos apresentaram aumento de massa corporal em relação à massa inicial, após 45, 66 e 111 dias da lesão.

Todos os grupos submetidos à desnutrição apresentaram massa corporal menor quando comparados aos grupos normalmente nutridos ($p \leq 0,05$).

A massa corporal média dos animais do grupo CD foi 68% menor quando comparado ao CN. O mesmo foi observado quando comparamos o grupo LN com o LD (43%) e o grupo CDR com LDR (19%).

4.2 Índice Funcional do Ciático (IFC)

Para o IFC a análise de variância foi realizada considerando-se, além do fator intergrupo, o fator intragrupos, com o objetivo de verificar a existência de interação entre eles, buscando assim investigar a possível ocorrência de comportamentos diferentes no decorrer do tempo, de acordo com o grupo.

4.2.1 Análise Intergrupo

A Tabela 4 mostra os valores médios do IFC nos diferentes grupos e nos diferentes tempos da avaliação funcional.

Tabela 4 – Valores de média \pm DP do Índice Funcional do Ciático (IFC) nos grupos Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR) nos diferentes tempos de análise, para comparação entre os grupos.

| Períodos | Grupos | | |
|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | LN | LD | LDR |
| Pré-operatório | -10,87 \pm 8,1 | -13,61 \pm 3,4 | -8,39 \pm 7,4 |
| 7º PO | -79,20 \pm 13,8 | -61,33 \pm 12,4 | -71,99 \pm 12,7 |
| 14º PO | -79,99 \pm 7,0 | -40,73 \pm 19,9* | -76,39 \pm 16,6 |
| 21º PO | -29,80 \pm 9,39 | -22,24 \pm 15,2 | -30,43 \pm 19,4 |

* Difere do grupo Lesado Normal (LN) no respectivo período; PO: Pós-operatório.

No período pré-operatório todos os grupos apresentaram valores entre 0 e -20, indicando função normal. Porém estes valores diminuíram no 7º e 14º dia pós-operatório (PO), representando uma perda funcional. No 21º dia PO os valores estavam próximos do índice de normalidade em todos os grupos.

No 14º dia PO o grupo LD apresentou IFC mais próximo da normalidade que o grupo LN ($p \leq 0,008$).

4.2.2 Análise intragrupos

A tabela 5 aponta a análise do resultado do IFC intragrupos.

Tabela 5: Valores de média \pm DP de IFC dos grupos Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR) nos diferentes tempos de análise para comparação intragrupos.

| Períodos | Grupos | | |
|----------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | LN | LD | LDR |
| Pré-operatório | -10,87 \pm 8,1 | -13,61 \pm 3,4 | -8,39 \pm 7,4 |
| 7º PO | -79,20 \pm 13,8* | -61,33 \pm 12,4* | -71,99 \pm 12,7* |
| 14º PO | -79,99 \pm 7,0* | -40,73 \pm 19,9* | -76,39 \pm 16,6* |
| 21º PO | -29,80 \pm 9,39†‡ | -22,24 \pm 15,2† | -30,43 \pm 19,4‡ |

*Difere do Pré-operatório; † Difere do 7ºPO; ‡ Difere do 14ºPO.

Todos os grupos apresentaram valores de IFC menores no 7º e 14º PO quando comparados ao pré-operatório ($p \leq 0,05$), o que indica uma perda funcional expressiva neste período.

No grupo LN o valor do IFC no 21º PO foi maior quando comparado ao 7º ($p \leq 0,000$) e 14º PO ($p \leq 0,045$). No grupo LD o valor de IFC no 21º PO foi maior quando comparado ao 7º PO ($p \leq 0,013$), enquanto no grupo LDR o IFC foi melhor quando comparado ao 14º PO ($p \leq 0,020$).

Vale ressaltar que no 21º PO nenhum dos grupos atingiu os valores de normalidade, mas o grupo LD foi o que mais se aproximou dos valores normais.

4.3 Análise histológica

Na [figura 8](#) observam-se as características histológicas do nervo isquiático nos grupos CN, CD, CDR, LN, LD e LDR.

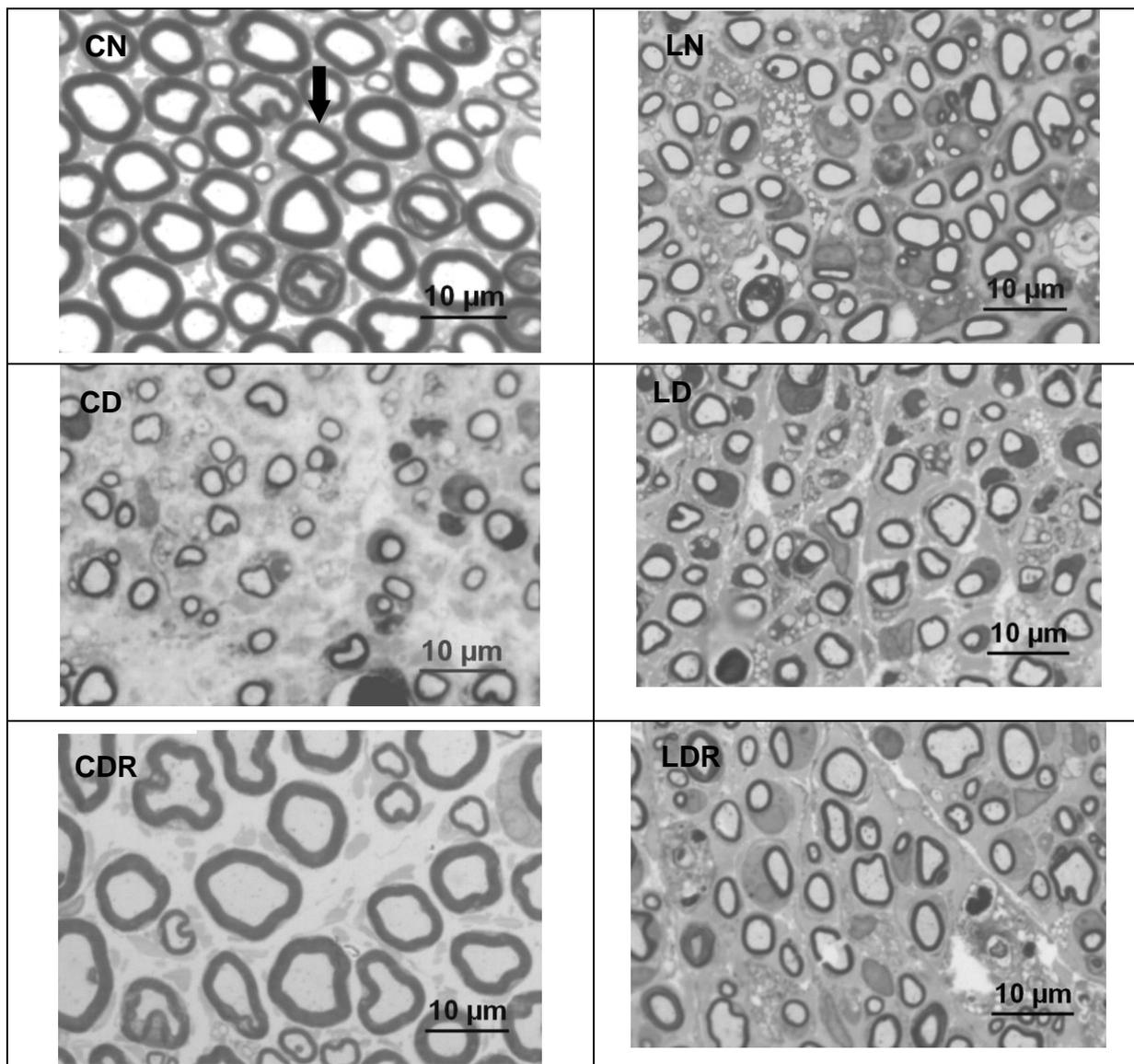


Figura 8: Micrografia em corte transversal do nervo isquiático dos animais dos grupos: Controle Normal (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD), Controle Desnutrido Recuperado (CDR) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR). Observar os diâmetros do axônio e da fibra nervosa, bem como a espessura da bainha de mielina (seta). Bar = 10 µm.

O grupo CN apresentou características histológicas de um nervo normal, incluindo o diâmetro dos axônios, o diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina. Nos grupos CD, LN, LD, LDR o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas aparentam ser menores que do grupo CN, assim como a espessura das bainhas de mielina, enquanto o grupo CDR apresenta

características morfológicas semelhantes à do grupo CN.

4.4 Análise quantitativa e morfométrica

A tabela 6 representa os resultados da análise quantitativa e morfométrica do nervo isquiático nos diferentes grupos.

Tabela 6: Valores médios \pm DP do número de axônios, diâmetro dos axônios (\odot Axônio), diâmetro das fibras (\odot Fibra), espessura das bainhas de mielina e razão G, nos grupos Controle Normal (CN), Controle Desnutrido (CD), Controle Desnutrido Recuperado (CDR), Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR).

| Grupo | Nº Axônios | \odot Axônio | \odot Fibra | Espessura Mielina | Razão G |
|------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CN | 10124,80 \pm 1703,10 | 5,73 \pm 0,29 | 9,35 \pm 0,45 | 1,74 \pm 0,11 | 0,60 \pm 0,01 |
| CD | 9218,28 \pm 2040,51 | 4,21 \pm 0,88* | 6,43 \pm 1,49* | 1,12 \pm 0,32*‡ | 0,65 \pm 0,02* |
| CDR | 8201,60 \pm 1137,17 | 7,15 \pm 0,56*† | 11,33 \pm 0,94† | 2,08 \pm 0,22† | 0,62 \pm 0,01 |
| LN | 9355,20 \pm 2428,23 | 3,79 \pm 0,18*‡ | 5,77 \pm 0,18*‡ | 0,97 \pm 0,11*‡ | 0,65 \pm 0,02 |
| LD | 9050,20 \pm 3386,35 | 4,18 \pm 0,92*‡ | 6,32 \pm 1,49*‡ | 1,06 \pm 0,28*‡ | 0,66 \pm 0,01* |
| LDR | 7967,11 \pm 2738,21 | 4,37 \pm 1,09*‡ | 6,60 \pm 2,12*‡ | 1,13 \pm 0,53*‡ | 0,66 \pm 0,03*‡ |

*Difere do CN; †Difere do CD; ‡Difere do CDR.

Não houve diferença no número de axônios, em todos os grupos ($p \leq 0,05$). Quanto ao diâmetro dos axônios, todos os grupos apresentaram valores menores que o grupo CN ($p \leq 0,05$), com exceção do grupo CDR, cujo valor foi superior ao do grupo CN ($p \leq 0,05$).

O diâmetro das fibras nervosas nos grupos CD, LN, LD, LDR foi menor que no grupo CN ($p \leq 0,05$). Quando comparados ao grupo CDR, os grupos LN, LD e LDR apresentaram menores diâmetros das fibras ($p \leq 0,05$).

A espessura das bainhas de mielina foi menor nos grupos CD, LN, LD e LDR em relação ao grupo CN ($p \leq 0,05$). Quando comparados ao grupo CDR, estes mesmos grupos apresentaram espessura de mielina menores ($p \leq 0,05$).

A razão G nos grupos CD, LD, e LDR foi maior em relação ao grupo CN ($p \leq 0,05$). O mesmo ocorre quando se compara o grupo LDR ao CDR ($p \leq 0,05$). Apesar da diferença estatística encontrada entre os grupos, todos os valores estão dentro da normalidade.

4.5 Histograma representativo dos diâmetros das fibras nervosas mielínicas

A figura 9 mostra o número de fibras nervosas mielínicas em relação aos respectivos diâmetros no nervo isquiático dos ratos dos grupos CN, CD, CDR, LN, LD e LDR. Nos grupos CN e CDR há predomínio de fibras com 10 μm de diâmetro, enquanto nos grupos LN, CD, LD e LDR predominam fibras entre 5 e 6 μm .

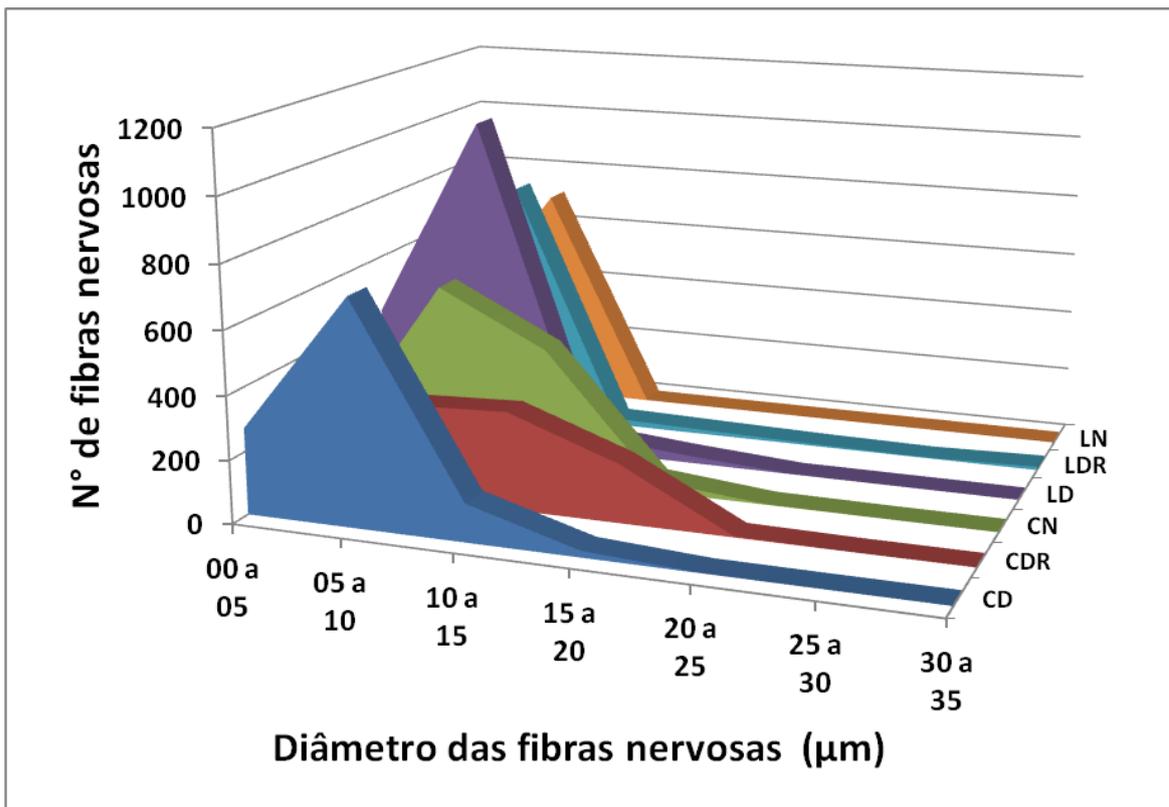


Figura 9: Histograma mostrando a distribuição dos calibres das fibras mielinizadas dos nervos isquiáticos dos animais dos grupos Controle Normal (CN), Controle Desnutrido (CD), Controle Desnutrido Recuperado (CDR), Lesado Normal (LN), Lesado Desnutrido (LD) e Lesado Desnutrido Recuperado (LDR).

5 DISCUSSÃO

5.1 Dieta Hipoproteica

Neste estudo foram utilizadas as dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) proposta por Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993). As duas dietas diferem apenas no conteúdo proteico, sendo preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição. A fonte de proteína utilizada foi a caseína, adequando-se os valores normais recomendados pelo autor. Segundo Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993), esse tipo de dieta possui um equilíbrio de nutrientes e é adequada para a dieta de roedores.

5.2 Massa corporal

A desnutrição proteica aplicada no início da vida (no momento do nascimento), foi descrita por Fukuda et al. (2002), que mantiveram filhotes durante o período de lactação e após desmame, até o 49º dia de vida, em gaiolas com dieta deficiente em proteína, contendo 6% de caseína, enquanto que a dieta rica em proteínas normais continha 16% de proteína. Este modelo de desnutrição interferiu no desenvolvimento da massa corporal, que se apresentou 40% menor quando comparada ao grupo que consumiu a ração normoproteica.

Bengelloun (1990) realizaram estudo com ratos desnutridos após o desmame, onde o grupo desnutrido recebeu uma ração com 8% de proteína, enquanto o grupo controle recebeu uma dieta com 21% de proteína. Após 60 dias o grupo desnutrido apresentou massa corporal 50% menor em relação ao grupo controle.

Neste estudo, a desnutrição foi iniciada após o desmame e, em relação aos estudos citados, promoveu redução mais agressiva da massa corporal (68%), por período mais curto de tempo (45 dias). Reeves, Nielsen e Fahey (1993) afirmam que esta dieta apresenta equilíbrio de nutrientes essenciais, se caracterizando como a melhor escolha para estudos de longo ou curto prazo com roedores.

O mesmo aconteceu quando foram comparados os grupos LD e LN. Ambos os grupos sofreram esmagamento do nervo isquiático, porém, o grupo que recebeu dieta hipoproteica apresentou massa corporal 43% menor. Quando a massa corporal do grupo LD foi comparada à do grupo CD, não se observa diferença significativa, sugerindo que a lesão nervosa não interferiu com a massa corporal dos animais, possivelmente porque a lesão compromete apenas os músculos inervados pelo nervo lesado, mas a desnutrição promoveu redução da massa corporal.

Outros métodos de desnutrição tem sido utilizados por diferentes autores. Jahnke e Bedi (2007) demonstraram que ratas submetidas à restrição de alimentos durante toda a gestação (21 dias), geraram filhotes com peso corporal 73% menor após 21 dias do nascimento. Souza et al. (2008) observaram que filhotes de ratas que passaram por um período de restrição alimentar ingerindo ração com baixa porcentagem de proteínas e ácidos graxos durante a gestação e lactação e cujos filhotes consumiram a mesma ração por 70 dias, apresentaram desnutrição severa e peso corporal 83% menor. No mesmo estudo, foi realizada uma recuperação nutricional na fase pós desmame e o grupo desnutrido na fase fetal e recuperado na fase pós desmame apresentou massa corporal semelhante ao grupo controle no 70º dia.

Diferentemente dos resultados de Souza et al. (2008), Amaral (2005) observou que a desnutrição nas fases iniciais da vida compromete de forma irreversível o padrão de crescimento, por afetar permanentemente a proliferação celular, comprometer o desenvolvimento dos animais e promover diminuição da massa muscular e corporal.

No presente estudo, não foi possível comparar a massa corporal dos grupos CDR e LDR ao grupo CN, pois a massa corporal final dos animais dos grupos CDR e LDR foi obtida no 111º dia de vida, enquanto o grupo CN teve a massa corporal aferida no 45º dia. Porém é interessante que a massa corporal dos grupos CDR e LDR não atingiu os valores do grupo CN, mesmo sendo os animais 66 dias mais velhos. Desta forma, pode-se considerar que a recuperação nutricional durante 45 dias não foi efetiva para garantir a recuperação da massa corporal, corroborando os resultados observados por Souza et al. (2008).

Gobatto (1991) relata que quando animais desnutridos passam pelo processo de reabilitação nutricional, é esperado um aumento significativo da massa corporal, porém o restabelecimento pode ser total ou não, dependendo principalmente de dois fatores fundamentais: a duração da desnutrição e o período do desenvolvimento no qual teve início à desnutrição. De fato, quanto mais cedo for iniciada a desnutrição menor será a evolução da massa corporal.

Independente do modo e fase da vida em que foi realizado o processo de desnutrição, todos os estudos citados anteriormente observaram um percentual menor de massa corporal, coincidindo com os achados do presente estudo, todos em comparação com seu respectivo grupo controle.

Uma das principais características da desnutrição é a massa corporal reduzida, característica também identificada no estudo de Zanin (2003), onde a

dieta hipoproteica promoveu redução no desenvolvimento corporal. Isso poderia ser justificado pelo fato de a dieta hipoproteica não oferecer o suprimento ideal de aminoácidos para a formação de hormônios e enzimas que atuam diretamente no desenvolvimento ponderal e de crescimento (Neiva e Mello, 1999).

O menor crescimento e ganho de peso dos animais alimentados com dieta hipoproteica abre possibilidade para diversas formas de discussão que estão relacionadas a mudanças funcionais dos órgãos, como por exemplo, alterações morfológicas do epitélio intestinal, comprometendo a digestão e a absorção dos nutrientes (Galdino et al., 2001; Natali et al., 2005; Souza, 2006; Moreira et al., 2008). Neste estudo também se observa que o nervo periférico sofreu significativas modificações em seu processo de maturação, o que será discutido a seguir.

5.3 Morfologia do nervo isquiático

No que se refere à análise morfométrica, inicialmente foi feita uma comparação dos grupos CD e CDR com o grupo CN, para compreensão das alterações causadas pela desnutrição e desnutrição/recuperação nutricional e, posteriormente, observação do comportamento frente à lesão do nervo isquiático.

O número de axônios não foi diferente entre os grupos, corroborando com o estudo realizado por Cornblath e Brown (1988), que avaliaram ratos desnutridos com lesão do nervo tibial posterior e relataram que o número de axônios foi idêntico ao grupo controle, não havendo evidência de degeneração ou desmielinização após quatro semanas de lesão. O mesmo estudo relatou ainda que o grupo desnutrido apresentou áreas endoneurais menores, menor número de fibras de grande diâmetro e espaços internodais mais curtos que os nervos

dos animais controle. Entretanto, as diferenças encontradas não afetaram a velocidade de condução nervosa. A desnutrição prejudicou o crescimento somático, interferindo com a maturação das fibras mielinizadas, mas sem causar alterações eletrofisiológicas e no padrão funcional do nervo.

Neste estudo, o grupo CD apresentou alterações na maturação do nervo isquiático, com diâmetro da fibra nervosa, diâmetro do axônio e espessura da bainha de mielina menores quando comparados aos dados do grupo CN, corroborando os achados de Morgane et al. (1993), que relataram que a desnutrição pré-natal (8% de proteína) alterou o desenvolvimento normal do cérebro, particularmente a maturação, afetando diretamente o desenvolvimento coordenado de vários tipos de células, provocando mudanças na formação de circuitos neuronais e o início da atividade dos neurotransmissores.

Lukoyanov e Andrade (2000) relatam que a privação de proteína em longo prazo em ratos adultos induz perda acentuada de neurônios e sinapses na formação do hipocampo e que as alterações morfológicas podem causar alterações comportamentais. Referem ainda que a reabilitação nutricional de ratos adultos privados de proteína leva à reorganização da estrutura do hipocampo e melhora parcialmente as deficiências comportamentais, apoiando a visão de que o SNC maduro apresenta um notável potencial de recuperação estrutural e funcional após esse tipo de insulto nutricional.

Debassio et al. (1994) descreveram que a desnutrição parece afetar o desenvolvimento do cérebro, incluindo o nascimento, migração e diferenciação celular, alterando a mielinização e sinaptogênese. Lecours et al. (2001) também descreveram que cérebros de ratos desnutridos são imaturos tanto metabólica quanto funcionalmente, devido ao menor número de neurônios, células gliais, a

alterações das conexões sinápticas e mielinização das fibras nervosas, diminuindo a velocidade de condução neural.

O sistema nervoso periférico e o central são funcionalmente integrados em relação às consequências de uma lesão nervosa, sendo que a lesão do nervo periférico sempre resulta em profundas e duradouras modificações e reorganização do sistema nervoso central (Kaas, 1991; Wall et al., 2002; Kaas e Collins, 2003).

Conexões neuronais ao longo do sistema nervoso desempenham um papel importante na regulação da expressão de características neuronais adequadas, incluindo a morfologia dendrítica e axonal, propriedades elétricas das membranas, produção de neurotransmissores e metabolismo molecular (Navarro et al., 2007).

No sistema nervoso periférico, Segura et al. (2001) demonstraram que a desnutrição perinatal (6% de proteína) causa redução na amplitude, área e velocidade do potencial de ação. Além disso, observaram diminuição da espessura da bainha de mielina, apesar de não ter havido alteração do diâmetro dos axônios nem do número de axônios. No presente estudo, somente o número de axônios não diferiu entre os grupos CD e CN.

Estudos anteriores apontam uma redução semelhante na bainha de mielina axonal (Bronzino et al., 1975; Bedi, 1994), nos nervos sensoriais e motores (Sima e Jankowska de 1976; Oldfords e Ullman, 1980; Cornblath e Brown, 1988) e nas raízes dorsais (Sima, 1974a; 1974b) de ratos desnutridos.

É fato que, de algum modo, a desnutrição gera alterações tanto no sistema nervoso central quanto periférico, o que é reafirmado neste estudo pelo atraso observado na maturação do sistema nervoso periférico.

Porém, quando há recuperação nutricional, o diâmetro dos axônios, diâmetro das fibras nervosas e a espessura das bainhas de mielina são superiores em relação aos grupos CD e CN, o que permite argumentar que após a recuperação nutricional o desenvolvimento adequado das características morfológicas do nervo isquiático é alcançado. O fato de se tratar de ratos jovens possivelmente tenha contribuído para esta maturação.

A restrição de proteínas na fase pré-natal, iniciada no momento da concepção e mantida durante as primeiras 2 semanas de gestação de ratos induziu astrogênese retardada, produção diminuída do ácido hialurônico na matriz extracelular, diferenciação neuronal anormal, diminuição da apoptose no córtex e no cerebelo, bem como sinaptogênese anormal dos gânglios da base, na terceira semana após o nascimento. Porém a análise do cérebro de ratos adultos não revelou alteração de sua arquitetura e da diferenciação neuronal, sugerindo elevado grau de plasticidade do cérebro em desenvolvimento (Gressens et al., 1997).

Os resultados observados neste estudo, no sistema nervoso periférico, mostram que a desnutrição gerou atraso no processo de maturação, porém, as condições estruturais do nervo foram reestabelecidas após a recuperação nutricional. Guthrie e Brown (1968) discutem que restrições nutricionais iniciadas em estágios tardios de crescimento resultam em redução reversível do tamanho celular.

Diante dos resultados que mostram o comportamento do processo de maturação do nervo em condições de desnutrição ou desnutrição/recuperação nutricional, na ausência de lesão, o comportamento do sistema nervoso periférico frente à lesão por esmagamento do nervo isquiático também foi analisado,

comparando-se os grupos LD e LDR ao grupo LN. Observou-se que, apesar de ter havido recuperação funcional em todos os grupos lesados após 21 dias da lesão, a recuperação morfológica do nervo isquiático regenerado não foi alcançada. O grupo LN atingiu 66,14% do diâmetro dos axônios, 61,71% do diâmetro das fibras nervosas e 55,74% da espessura das bainhas de mielina em relação ao grupo CN. O grupo LD atingiu 72,94% do diâmetro dos axônios, 67,59% do diâmetro das fibras nervosas e 60,91% da espessura das bainhas de mielina em relação ao grupo CN. O grupo LDR atingiu 76,26% do diâmetro dos axônios, 70,58% do diâmetro das fibras nervosas e 64,94% da espessura das bainhas de mielina em relação ao grupo CN.

Outros estudos que analisaram a recuperação dos parâmetros morfométricos do nervo isquiático regenerado em animais normalmente nutridos após axoniotmese (Oliveira et al., 2008; Takeda et al., 2008; Sobral et al., 2008; Teodori et al., 2011) apontam que o diâmetro dos axônios recuperou entre 52 e 64% dos valores controle, enquanto o diâmetro das fibras nervosas recuperou entre 58 e 68% e a espessura das bainhas de mielina entre 62 e 68%. Desta forma, neste estudo os parâmetros morfométricos foram recuperados dentro do previsto para o tipo de lesão realizada (axoniotmese), sendo que os grupos desnutridos e desnutridos recuperados, em geral, apresentaram recuperação mais expressiva.

Observou-se, também, que a condição nutricional não influenciou a resposta regenerativa, ou seja, a desnutrição compromete a maturação do sistema nervoso periférico, mas não atrasa o processo de regeneração nervosa após axoniotmese.

Esta capacidade regenerativa de animais desnutridos poderia ser justificada pela teoria do “fenótipo poupador”, proposta por Hales e Barker (1992), a qual postula que o ambiente fetal e pós-fetal, especialmente a nutrição, desempenham um papel importante na determinação da susceptibilidade de um indivíduo para a diabetes tipo 2 e outras doenças. Os autores ainda relatam que a desnutrição fetal ocorre quando a demanda fetal por nutrientes excede a oferta, por exemplo, como resultado da desnutrição materna ou disfunção placentária. Na medida em que o feto responde e se adapta à má nutrição, adota uma série de estratégias para melhorar suas chances de sobrevivência pós-natal. Primeiro os nutrientes são seletivamente distribuídos para proteger os tecidos que são importantes para a sobrevivência imediata, especialmente o tecido nervoso. Isto ocorre à custa de outros órgãos e tecidos como o fígado, pâncreas e músculos. Além disso, relatam haver uma programação metabólica que leva à alteração do metabolismo pós-natal, benéfico para a sobrevivência em condições de má nutrição pós-natal. Se o feto nasce e sobrevive em condições de má nutrição, não há efeitos nocivos para a sua saúde em longo prazo. Isso explicaria a baixa prevalência de diabetes em populações de zonas rurais da África, ambiente conhecido pela presença de desnutrição crônica. No entanto, a saúde em longo prazo é afetada se o feto desnutrido nasce em condições de nutrição adequada. Os autores ainda relatam que as diferentes programações do metabolismo no pré e pós-natal somado a fatores como a obesidade, sedentarismo e o envelhecimento, podem resultar no desenvolvimento de diabetes tipo 2 e outras características de síndrome metabólica. Isto é evidente em populações que migraram de países pobres para regiões urbanas, onde há

má nutrição intrauterina e pós-natal encontrada em regiões pobres, seguida de uma nutrição normal ou “supernutrição”, característica das áreas urbanas.

Nesse sentido, o fato de a desnutrição não ter comprometido de forma evidente a resposta regenerativa do sistema nervoso periférico pode significar que esta condição de baixa oferta proteica teria direcionado as reservas proteicas, de forma seletiva, para o tecido nervoso, no sentido de garantir sua função.

Embora a desnutrição cause alterações no sistema nervoso periférico, a razão G, que corresponde à divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa e que reflete a velocidade de condução do impulso nervoso através do nervo, está dentro dos padrões de normalidade para uma velocidade de condução nervosa ideal, ou seja, entre 0,5 e 0,7 (Ansellin, Fink e Davey, 1997), caracterizando a proporcionalidade entre diâmetro do axônio e diâmetro das fibras nervosas, sugerindo que, em todos os grupos, a velocidade de condução nervosa estaria normal.

5.4 Análise funcional da marcha

A recuperação funcional, avaliada pelo Índice Funcional do Ciático (IFC) fornece informações importantes da pata pélvica do animal, além de ser o método que mais se aproxima da avaliação clínica (De Medinacelli et al., 1982). Trata-se de um método não invasivo, confiável e de fácil aplicação, que aponta o resultado efetivo do processo de regeneração nervosa periférica.

Neste estudo, no período pré-operatório os animais de todos os grupos apresentaram valores de IFC dentro da normalidade, segundo os critérios

apontados por Hare et al. (1992) e Dash et al. (1996). No período pós-operatório, os grupos LN e LDR apresentaram valores próximos a $\bar{100}$ no 7° e 14° PO, indicando uma perda funcional que já era esperada devido à lesão nervosa. Porém o que chama a atenção é a melhora funcional apresentada pelo grupo LD a partir do 14° PO, caracterizada por uma aceleração da regeneração nervosa em relação ao grupo LN no mesmo período. No entanto, no 21° PO, apesar de terem alcançado valores próximos à normalidade, nenhum grupo alcançou valores entre 0 e $\bar{20}$, considerados valores de normalidade.

Considerando a avaliação qualitativa do IFC proposta por Constantin et al. (2012), que classifica valores entre 12 e $\bar{12}$ como “Excelente”; entre $\bar{13}$ e $\bar{37}$ como “Bom”; entre $\bar{38}$ e $\bar{62}$ como “Médio”; entre $\bar{63}$ e $\bar{87}$ como “Insatisfatório” e entre $\bar{88}$ e $\bar{137}$ como “Déficit completo”, neste estudo os grupos LN e LDR apresentaram valores de IFC pré-operatório classificados como “Excelente”, enquanto o grupo LD apresentou valor considerado “Bom”. Já no 7° PO, os grupos LN e LDR foram classificados como “Insatisfatório” e o grupo LD como Médio. No 14° PO a classificação dos grupos foi a mesma do 7° PO, enquanto no 21° PO todos os grupos foram classificados como “Bom”. Neste contexto, todos os grupos lesados obtiveram boa recuperação funcional após 21 dias da axoniotmese.

A literatura aponta que o tempo transcorrido entre a lesão e a reinervação muscular é crucial para a recuperação funcional, pois a desnervação causa redução da área de secção transversa do músculo (atrofia muscular), bem como proliferação de tecido conjuntivo intramuscular (Fernandes et al., 2005), o qual atua como barreira mecânica ao suprimento sanguíneo para as fibras musculares, contribuindo para a atrofia (Caierão et al., 2008), além de interferir com a

reinervação muscular, atuando como barreira mecânica à reconexão do terminal nervoso com os receptores da junção neuromuscular (Carter et al., 1998). Torna-se necessário uma avaliação quantitativa da área de secção transversa das fibras dos músculos inervados pelo nervo isquiático, bem como uma análise da densidade de área de tecido conjuntivo nestes músculos para identificar a influência da desnutrição e recuperação nutricional sobre as características morfológicas dos mesmos. Este estudo será realizado posteriormente.

5.5 Histograma

Nos nervos periféricos, as fibras motoras somáticas e proprioceptivas são as mielínicas de maior diâmetro, enquanto que as sensoriais que mediam os impulsos sensitivos são as de menor diâmetro (Johnson, Zoubos e Soucacos, 2005).

Entre as fibras de grande diâmetro estão as sensitivas A α que inervam as terminações ânulo-espinais dos fusos neuromusculares e órgão neurotendinoso de Golgi (16 à 17 μ m), além das fibras motoras A α que inervam grandes fibras musculares esqueléticas (14 μ m). As fibras de menor calibre são representadas pelas fibras sensitivas A β e A γ , que inervam receptores táteis cutâneos e terminações nervosas em buquê dos fusos neuromusculares (8 μ m), além das fibras A δ que conduzem sensações de temperatura, tato grosso e dor em picada (3 μ m) e das fibras motoras A γ que inervam as fibras musculares esqueléticas intrafusais (5 μ m) (Guyton e Hall, 2002).

A distribuição dos diâmetros das fibras nervosas nos diferentes grupos experimentais deste estudo mostra que os grupos CN e CDR, os quais não foram submetidos à lesão nervosa, apresentaram o maior número de fibras nervosas

com calibre entre 10 e 12 μm , correspondendo provavelmente às fibras motoras A α , que inervam grandes fibras musculares esqueléticas. Nota-se, entretanto, que no grupo CD, que também não foi submetido à lesão nervosa, o maior calibre apresentado pela maioria das fibras nervosas estava entre 6 e 8 μm , reforçando que a desnutrição compromete a maturação normal das fibras do nervo isquiático. Estes achados reafirmam os resultados de Cornblath e Brown (1988), que observaram número reduzido de fibras nervosas de grande diâmetro em animais desnutridos.

Nos grupos submetidos à lesão nervosa, o maior calibre apresentado pela maioria das fibras nervosas no grupo LN estava entre 5 e 6 μm , no grupo LD entre 5 e 7 μm e no grupo LDR entre 5 e 8 μm , sendo que o diâmetro das fibras nervosas de nenhum dos grupos lesados alcançou os valores do nervo controle, confirmando o observado a partir dos dados morfométricos.

Estes dados corroboram os achados de Prodanov e Feirabend (2007) que realizaram um estudo com o nervo isquiático de ratos sem lesão e normalmente nutridos, onde o número de fibras de menores diâmetros foi superior ao das de grande diâmetro. More et al. (2011) encontraram um resultado semelhante em um estudo que avaliou o método semi-automatizado para identificar e medir as fibras nervosas mielinizadas em imagens de microscopia eletrônica de varredura em nervo isquiático de ratos sem lesão.

Os resultados da distribuição dos calibres das fibras nervosas regeneradas obtidos neste estudo caracterizam que a regeneração nervosa é um processo e que tanto as fibras de maior calibre no nervo quanto as de menor calibre estão em processo de maturação, no qual as lamelas de mielina se depositam progressivamente ao redor dos axônios até um determinado limite, pois após

degeneração Walleriana, fibras regeneradas nunca alcançam os diâmetros de fibras normais, como foi confirmado nos estudos de Santo Neto et al., 2004; Oliveira et al., 2008; Takeda et al., 2008; Sobral et al., 2008; Teodori et al., 2011.

6 CONCLUSÃO

- A desnutrição em ratos recém desmamados causou atraso na maturação do sistema nervoso periférico, o qual apresentou parâmetros morfométricos reduzidos em relação ao controle;
- A recuperação nutricional após 45 dias de desnutrição em ratos recém desmamados foi efetiva para garantir o restabelecimento das condições estruturais do nervo.
- Após lesão nervosa os parâmetros morfométricos foram reduzidos em relação ao controle, porém, os animais que passaram por um período de desnutrição tiveram a regeneração nervosa priorizada, apesar da condição morfológica do nervo não ter sido alcançada após 21 dias da lesão em quaisquer dos grupos;
- O grupo desnutrido apresentou recuperação mais precoce da funcionalidade para a marcha em relação aos demais grupos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou o comportamento do nervo isquiático durante o processo de desnutrição, desnutrição/renutrição e diante de uma lesão por esmagamento. Sabe-se que, apesar das profundas modificações ocorridas no nervo periférico após lesão, o sistema nervoso central também sofre alterações, o que sugere a necessidade de futuros estudos para investigar estas modificações em condições de desnutrição.

A partir dos dados obtidos neste estudo, o grupo de pesquisa “Plasticidade Neuromuscular” prevê a investigação do comportamento do sistema nervoso periférico de animais desnutridos diante de diferentes formas de intervenção fisioterapêutica para tratamento da lesão nervosa. Tais estudos poderão fornecer subsídios para uma adequada conduta clínica diante de lesões nervosas periféricas em indivíduos desnutridos ou submetidos a esta condição na infância.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ACC/SCN (United Nations Administrative Committee on Coordination / Sub-Committee on Nutrition) in collaboration with International Food Policy Research Institute (IFPRI). Nutrition through the life cycle. In ACC / SCN in collaboration with IFPRI - Fourth Report on the World Nutrition Situation. Geneva 1-20, 2000.

Amaral DA. Avaliação Bioquímica, Nutricional e Cardiopulmonar de Ratos Recuperados de uma Desnutrição Protéica. [dissertação]. NUPEBUFOP.2005.

Ansellin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997; 23: 387-398.

Alamy M, Errami M, Taghzouti K, Sadiki-Traki F, Bengelloun WA. Effects of postweaning undernutrition on behavior, memory and sensory reactivity in rats: implications of the dopaminergic system. *Physiol Behav.* 2005;86, 195–202.

Alves AP, Dâmaso AR, Pai VD. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr.* 2008; 84 (3): 264-271.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(1): 129-138.

Bengelloun WA. Kwashiorkor: behavioural indices of neurological sequelae. In: (Mal) Nutrition and the Infant Brain. Wiley-Liss. 1990:65–81.

Bedi KS. Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. *J. Comp. Neurol.*1994; 342: 596-602.

Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Conte da Frota Jr, ML, Dal-Pizzol F, Rotta LN, et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.* 2005;1:17–22.

Bronzino JD, Morgane JP, Forbes WB, Stern WC, O. Resnick Ontogeny of visual evoked responses in rats protein-malnourished during development. *Biol Psychiatr.*1975; 10: 175–184.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. *Ver. Bras.Fisiot.* 2008; 12(2): 143-148.

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg [Br]* 1998; 23(3): 365-369.

Camargo LMM, Almeida SS. Early postnatal protein malnutrition changes the development of social play in rats. *Physiol Behav.* 2005;85 (3), 246–251.

Carmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation- I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neurosci.* 1983; 8(3): 393-401.

Cornblath DR, Brown MJ. Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves. *Exp Neurol.* 1988;99: 403–411.

Constantin AM, Login C, Bondor C, Tache S, Moldovan R. The effects of exercise on rat sciatic nerve regeneration. *Palestrica Of the Third millennium – Civilization and Sport.* 2012;13(2) 130-134.

Dash H, Kononov A, Prayson RA, Petras S, Browne EZ. Evaluation of nerve recovery from minimal-duration crush injury. *Ann Plast Surg.* 1996; 37: 526-531.

Chopra JS, Dhand UK, Mehta S, Bakshi V, Rana S, Mehta J. Effect of protein calorie malnutrition on peripheral nerves. A clinical, electrophysiological and histopathological study. *Brain.* 1986; 109 (Pt2): 307-323.

Debassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain. Res Bull.* 1994; 35 (1), 57–61.

Debassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull.* 1996; 41 (6), 379–383.

De Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77(3): 634-643.

Díaz-Cintra S, Diaz-Cintra L, Galvan A, Aguilar A, Kemper TL, Morgane PJ. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentate. *J Comp Neurol.* 1991;310:356–364.

Eberstein, A. Eberstein, S. Electrical stimulation of denervated muscle : is it worthwhile. *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28(12)1463-1469.

Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter.* 2005; 9(2) 235-241.

Ferreira AS. *Lesões Nervosas Periféricas: Diagnóstico e tratamento.* 2ª ed. São Paulo: Santos; 2001.

Ferreira SC, Martinez AMB. O processo de degeneração Walleriana e os eventos moleculares nele envolvidos - uma revisão com enfoque no sistema nervoso periférico. *Fisioterapia Brasil.* 2000; 1(2): 109-115.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13: 43-60.

Frota MA, Pásco EG, Bezerra MDM, Martins MC. Má alimentação: fator que influencia na aprendizagem de crianças de uma escola pública. *Rev APS.* 2009; 12 (3): 278-284.

Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Almeida SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2002; 133: 271-277.

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.

Gobatto CA. Efeitos da desnutrição protéico calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após teste de cargas progressivas. *Ciência e Cultura, Rio de Janeiro.* 1991; (43): 725-726.

Golden MHN. The development of concepts of malnutrition. *J Nutr* 2002;132(2):117-122.

Gomez F. Desnutrición. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mexico.* 1946;(3): 543-551.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi Mg. Muscle reinnervation –II Sprouting, synapse formation and repression. *Neurosci. [S.L].* 1983; 8(3):403-16.

Gressens P, Muaku SM, Besse L, Nsegbe L, Gallego J, Delpech B. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997; 103 (1): 21–35.

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

Guthrie HÁ, Brown ML. Effect of severe undernutrition in early life on growth, brain size and compositions in adult rat. *J. nutri.* 1968; 94:419-426.

Guyton AC, Hall JE. Tratado De Fisiologia Médica 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.

Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) *diabetes mellitus*: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 35(7):595-601.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP et al. Walkingtrack analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89: 251-258.

Hernandes AS, Franc OL, Valadares CT, Fukuda MTH, Almeida SS. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 2005;162 (2):240–245.

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. *Rev Saúde Pública*. 1996; 30(6): 506-511.

Insegurança alimentar diminui, mas ainda atinge 30,2% dos domicílios brasileiros. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. [acesso jan 2014]. Disponível em <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?id=1&idnoticia=1763&view=noticia>

Jahnke , Bedi KS. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain Res*. 2007; 1143: 60–69.

Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2005;36 Suppl 4:24-29.

Kaas JH. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Rev. Neurosci*. 1991;14:137–167.

Kaas JH, Collins CE. Anatomic and functional reorganization of somatosensory cortex in mature primates after peripheral nerve and spinal cord injury. *Adv. Neurol*. 2003; 93: 87–95.

Lecours AR. Mandujano M, Romero G. Ontogeny of brain and cognition: relevance to nutrition research. *Nutr Rev*. 2001;59:7-11.

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

Lukoyanov NV, Andrade JP .Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res*. 2000;112 (1–2):85–97.

Marcondes E. Crescimento e desenvolvimento da criança: Aspectos éticos.in: Congresso do Instituto da Criança;1986. São Paulo.1986; 8: 166-168.

Moreira NM, Hermes C, Almeida CSL, Santana EC, Sant'ana DMG, Araújo 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.

Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of pré natal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26: 471-483.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Cintra L, Kemper T, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993 17(1):91-128.

Mendonça AC, Barbieri, CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods.* 2003;129:183-190.

More HL, Chen J, Gibson E, J. Donelana MJ, Beg MF. *J Neurosci Methods.* 2011; 201: 149– 158.

Moysés APA, Lima GZ. Fracasso escolar, um fenômeno complexo: Desnutrição apenas mais um fator. *Pediatr (São Paulo).* 1983;5: 263-269.

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.

Nascimento OJ, Madi K, Guedes e Silva JB, Soares Filho PJ, Hahn MD, Couto B, et al. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 1990;48:395-402.

Navarro X , Vivó M, Valero-Cabré A .Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 2007;82(4): 163-201

Neiva CM, Melo MAR. Análise dos efeitos da desnutrição proteico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single session) parâmetros metabólicos. *Motriz.*1999; 1(1): 32-37.

Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J Pediatr.* 2002; 78 (1): 39 -44.

Oliveira LS, sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Teodori RM. Estimulación Electra y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperacion funcional. *Rev Neurol.* 2008; 47(1):11-15.

Oldfords UM Ullman M. Motor nerve conduction velocity and nerve fibre diameter in experimental protein deprivation. *Acta Neuropathol.*1980; (51):215–221.

Prodanov D, Feirabend HKP. *Journal of Comparative Neurology* 2007; 503(1): 85-100.

Reid CL, Campbell IT. *Metabolic Physiology. Curr Anaesth Crit Care.* 2004; 15: 209-217.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.

Sampaio VF. Efeitos da desnutrição protéico precoce e da estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos [Tese]. Ribeirão Preto: USP. 2009.

Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:389-442.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. Primary nerve repair by muscle autografts prepared with local anesthetic. *Microsurgery.* 2004; 24(3): 188-93.

Schiesser M, Muller S, Kirchhoff P, Breitenstein S, Schafer M, Clavien, PA. Assessment of a novel screening score for nutritional risk in predicting complications in gastro-intestinal surgery. *Clin Nutr.* 2008; 27(4): 565-570.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237-88. In: Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 2004; 16(5): 1-7.

Segura, JC, Guadarrama AL, Gutierrez H, Merchant L, Cintra IJ. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci.* 2001;(4):475-488.

Sima A. Studies on fibre size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal undernourished and rehabilitated rats. *Acta Physiol Scand. Suppl.* 1974a;406: 5-55 .

Sima A. Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibres of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal undernourished and rehabilitated rats. *Acta. Physiol Scand. Suppl.* 1974b (410):1-38 .

Sima A, Jankowska E. Sensory nerve conduction velocity as correlated to fibre size in experimental undernutrition in the rat. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* 1976; (1):31-37.

Sobral LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM, Immediate versus later exercises for rat sciatic nerve regeneration after axonotmesis: histomorphometric and functional analyses, *Rev Bras Fisioter.* 2008;12(4):311–316.

Souza AS, Pacheco LC, Castro PS, Hokoc, JN, Rocha MS, Tavares do Carmo MG, Brain fatty acid profiles and spatial learning in malnourished rats: effects of nutritional intervention. *Nutr Neurosci.* 2008;11:119–127.

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] Rio de Janeiro: UFRJ; 2006

Teodori RM, Joice B, Larissa SO, Luciane LS, Sibeles YMT, Maria ILM. Swimming Exercise in the Acute or Late Phase after Sciatic Nerve Crush Accelerates Nerve Regeneration. *Neural Plasticity.* 2011; 12(4): 311-318

Tomkins A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. *Proc Nutr Soc.* 2000;59:135-146.

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

Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004; 26(2): 186-194.

Zanin STM, Molinari SL, Sant'ana DMG, Miranda-Neto, MH. Neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) desnutridos, aspectos quantitativos. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003; 61 (3-A): 650-653.

Wall JT, Xu J, Wang X. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. *Brain Res. Rev.* 2002;39: 181–215.

Waterlow JC. Kwashiorkor revisited: the pathogenesis of edema in kwashiorkor and its significance. *Transactions of the Royal Society of Tropical. Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78: 436-441.

Waterlow JC, Alleyne GAO. Má nutrição protéica em crianças: Evolução dos conhecimentos nos últimos dez anos. São Paulo, Pancast, 1974; 527-535.

Waterlow JC. Malnutrición proteico-energetica. Organización Panamericana de la Salud (Publicação científica n° 555). Washington.1996; 762-775.

ANEXO 1

Universidade Metodista de Piracicaba
Comitê de Ética sobre o Uso de Animais



Piracicaba, 16 de maio de 2012.

Para: Profa. Rosana Macher Teodori
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 01/12

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de pesquisa nº 01/12 intitulado "*Influência do estado nutricional de ratos sobre a recuperação das características morfológicas do músculo desnervado*" analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Alberto da Silva', is written on a light green rectangular background.

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente do CEUA-UNIMEP