

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Imunorreatividade de proteínas estruturais no córtex motor de
ratos submetidos à desnutrição proteica e axoniotmese

Paigý Costa

2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PAIGY COSTA

Imunorreatividade de proteínas estruturais no córtex motor de ratos submetidos à desnutrição proteica e axoniotmese

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: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor.

Orientador: Prof^a Dr^a Rosana Macher Teodori

PIRACICABA
2015

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Carolina Segatto Vianna CRB-8/7617

C837i Costa, Paigy
Imunorreatividade de proteínas estruturais no córtex motor
de ratos submetidos à desnutrição proteica e axoniotmese /
Paigy Costa. – 2015.
87 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Macher Teodori.
Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de
Piracicaba, Fisioterapia, 2015.

1. Desnutrição Proteica. 2. Regeneração Nervosa
Periférica. 3. Axoniotmese. 4. Proteínas Estruturais. 5. Córtex
Cerebral. 6. Plasticidade. I. Teodori, Rosana Macher. II.
Título.

CDU – 615.8

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Ima pelo amor incondicional e incentivo durante toda minha vida.

Às minhas irmãs Yvy e Cristiane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar as “ferramentas” necessárias para lutar e conquistar este desafio em minha vida.

À minha Família, em especial meus pais (Ima e Paulo), pelo incentivo constante, pelo carinho incondicional, pela força de vontade que só eles têm e souberam passar para mim. Agradeço por todos estes anos de sacrifício para me proporcionar os melhores parâmetros possíveis para conseguir alcançar meus objetivos.

À minha irmã Yvvy, que soube me incentivar nas melhores horas possíveis e me “aguentar” nas piores horas. Agradeço pela tranquilidade e sabedoria que soube me passar. Te amo.

À minha irmã Cristiane, que mesmo distante soube me incentivar e transmitir um carinho especial.

À minha namorada Silvia Belissa, pelo incentivo, amor e pelos “puxões de orelha” sempre que necessário. Obrigado por me aguentar durante a fase mais difícil da minha vida profissional, sem você não teria conseguido.

Às 4 mulheres importantíssimas da minha vida, que souberam de alguma forma, me dar a base necessária para passar por estes 2 anos de muita luta: minha tia Irene; Nicéia - nunca conseguirei retribuir o que fez por mim nestes 2 anos; minha madrinha Maria Luiza, que junto com meu padrinho (Elias) souberam diminuir as saudades de minha casa; minha sogra Maria Helena, que em pouco tempo já se tornou uma amiga maravilhosa.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Rosana Macher Teodori, que durante estes 4 anos de pesquisa juntos, soube me desenvolver como pesquisador, e principalmente como pessoa. Sou muito grato pelo carinho e atenção que me passou durante estes anos como orientadora.

Às Profas. Dra. Raquel Simone Pires e Dra. Caroline Real Gregório, pela fundamental colaboração durante este projeto tão desafiador. Com muita competência e qualidade participaram de forma decisiva para a conclusão deste estudo.

À Profa. Dra. Maria Imaculada de Lima Montebelo, pelas orientações, sempre pertinentes, e pela amizade durante os anos de graduação e mestrado.

À Profa. Patrícia Carla Paulino, que muito contribuiu para a realização deste estudo.

À Capes/Prosup, pelo apoio financeiro para conseguir completar este estudo da melhor forma possível.

Agradeço por fim, aos meus “irmãos” do Piracicaba Rúgby, que durante estes dois anos de convivência me proporcionaram a confiança necessária para finalizar meu estudo. Sem vocês não teria conseguido.

“Never give up on something that you can’t
go a day without thinking about.”

Sir Winston Churchill

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL	1
1.1.1 DESNUTRIÇÃO X SISTEMA NERVOSO CENTRAL	1
1.2 ASPECTOS ANATÔMICOS DO CÓRTEX MOTOR	4
1.2.1 MICROTÚBULOS E NEUROFILAMENTOS	7
1.3 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO (SNP) E DESNUTRIÇÃO	9
1.4 JUSTIFICATIVA	14
1.5 HIPÓTESE	15
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	17
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	17
3.3 TRATAMENTO NUTRICIONAL	18
3.4 MASSA CORPORAL	19
3.5 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	20
3.6 COLETA DO MATERIAL E PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	21
3.7 PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS DADOS	25
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 MASSA CORPORAL	27
4.2 IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS MICROTÚBULOS (MAP2) E AOS NEUROFILAMENTOS (PAN)	28
4.2.1 GRUPOS CONTROLE – MAP2	28
4.2.2 GRUPOS SUBMETIDOS À AXONOTMSE – MAP2	32
4.2.3 GRUPOS CONTROLE – PAN	34
4.2.4 GRUPOS SUBMETIDOS À AXONOTMSE – PAN	38
5 DISCUSSÃO	41

5.1 MODELO EXPERIMENTAL	41
5.2 DIETA HIPOPROTECIA	41
5.3 MASSA CORPORAL	42
5.4 IMUNORREATIVIDADE DE MAP2 E PAN X DESNUTRIÇÃO	44
5.5 IMUNORREATIVIDADE DE MAP2 E PAN X LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA X DESNUTRIÇÃO	48
6 CONCLUSÃO	52
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	53
8 ETAPAS FUTURAS	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS	76

RESUMO

A desnutrição é um problema de saúde pública, sendo a principal causa de mortalidade infantil no Brasil. Suas consequências podem perdurar por toda a vida. O sistema nervoso central é altamente sensível à desnutrição, sofrendo diminuição de massa e modificações funcionais. Além da desnutrição, a lesão nervosa periférica é outra situação que acarreta intensa reorganização cortical, principalmente no córtex motor. Os microtúbulos e neurofilamentos tem sua estrutura comprometida nas duas condições (desnutrição e desnervação), o que pode alterar a imunorreatividade das proteínas a eles associadas. Entretanto, não foram identificados estudos que avaliem a imunorreatividade das proteínas associadas aos microtúbulos (MAP2) e aos neurofilamentos (PAN) na condição de desnutrição e lesão nervosa periférica. Este estudo avaliou os efeitos da desnutrição proteica e da axoniotmese sobre a imunorreatividade de MAP2 e PAN, nos córtices motores primário (M1) e secundário (M2), por serem áreas responsáveis pela motricidade. Dezesesseis ratos *Wistar* foram divididos nos grupos: Controle Nutrido (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Nutrido (LN) e Lesado Desnutrido (LD). A massa corporal foi aferida semanalmente e os dados submetidos ao teste t, seguido de Anova (um critério). A imunorreatividade de MAP2 e PAN foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica, sendo as diferenças de densidade integrada (DI) destas proteínas entre os grupos analisada pelo teste de Mann-Whitney. Para análise das diferenças de DI unilateral aplicou-se o teste Anova (um critério) seguido de Tukey. Considerou-se o nível de significância de 5%. A massa corporal dos grupos CD e LD foi menor que nos respectivos controle ($p < 0,01$). A média da DI de MAP2 e PAN foi menor no grupo CD em relação ao CN em M1 e M2 ($p = 0,02$). Em análise bilateral, a DI de MAP2 e PAN em M1 e M2 foi menor em CD em relação à CN tanto no lado controle quanto no experimental ($p < 0,05$). Após lesão periférica, a DI média de MAP2 e PAN reduziu em LD em comparação ao LN ($p = 0,02$). Em análise unilateral, a DI no lado experimental foi sempre menor que no lado controle ($p < 0,01$), em M1 e M2, sendo a redução mais severa nos grupos desnutridos. Conclui-se que a desnutrição promoveu redução da imunorreatividade de MAP2 e PAN nos córtices M1 e M2; a lesão nervosa, mesmo em condição nutricional normal, promoveu redução da imunorreatividade de MAP2 e PAN nos córtices M1 e M2 contralateral à lesão; a desnutrição associada à axoniotmese potencializou a redução da DI das proteínas analisadas no córtex motor primário e secundário, sugerindo que a recuperação funcional em animais submetidos a axoniotmese e desnutridos seria ainda mais prejudicada. Estes resultados são relevantes para a definição de estratégias específicas para reabilitação da lesão nervosa periférica na condição de desnutrição.

Palavras-Chave: Desnutrição Proteica, Regeneração Nervosa Periférica, Axoniotmese, Proteínas Estruturais, Córtex Cerebral, Plasticidade.

ABSTRACT

Malnutrition is a public health problem and is the leading cause of infant mortality in Brazil. Its consequences can last for a lifetime. The central nervous system is highly sensitive to malnutrition, suffering from decreased mass and functional changes. In addition to malnutrition, peripheral nerve injury is another situation that causes intense cortical reorganization, especially in the motor cortex. Microtubules and neurofilaments has impaired its structure in both conditions (malnutrition and denervation), which can change the immunoreactivity of proteins associated with them. However, were not identified studies that assess the immunoreactivity of proteins associated with microtubules (MAP2) and neurofilament (PAN) in the malnutrition condition and peripheral nerve injury. This study evaluated the effects of protein malnutrition and axonotmesis on immunoreactivity of MAP2 and PAN in primary (M1) and secondary (M2) motor cortices, being areas responsible for motor function. Sixteen Wistar rats were divided into groups: Nourished Control (NC), Malnourished Control (MC), Injured Nourished (IN) and Injured Malnourished (IM). The body mass was measured weekly and the data submitted to t test, followed by ANOVA (a criterion). The immunoreactivity of MAP2 and PAN was evaluated by immunohistochemistry, and the differences of integrated density (ID) of these proteins among the groups analyzed by the Mann-Whitney test. For the analysis of unilateral ID differences, ANOVA (a criterion) followed by Tukey test were applied. We considered the significance level of 5%. The body mass of the NC and IM group was lower than in corresponding controls ($p < 0.01$). The ID of MAP2 and PAN was lower in the MC group compared to the NC, in both M1 and M2 motor cortex ($p = 0.02$). In bilateral analysis, the ID of MAP2 and PAN, in both M1 and M2 motor cortex was lower in MC compared to NC group, in both cerebral hemispheres ($p < 0.05$). Following peripheral injury, the ID of MAP2 and PAN was lower in IM group compared to the IN ($p = 0.02$). In unilateral analysis, the ID on the experimental side in IN and IM groups, was always lower than in the control side ($p < 0.01$) in M1 and M2, being the most severe reduction in the malnourished groups. We conclude that malnutrition promoted reduction of immunoreactivity of MAP2 and PAN in M1 and M2 cortices; nerve damage, even in a normal nutritional status, promoted a reduction in immunoreactivity of MAP2 and PAN in M1 and M2 cortices contralateral to the lesion; malnutrition associated with axonotmesis enhanced the reduction of the ID proteins analyzed in primary and secondary motor cortex, suggesting that functional recovery in animals submitted to crush injury and malnourished would be further impaired. These results are relevant to the definition of specific strategies for rehabilitation of peripheral nerve injury in malnutrition condition.

Key Words: Protein malnutrition, Peripheral nerve regeneration, Axonotmesis, Structural proteins, Cerebral cortex, Plasticity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Nervoso Central (SNC)

O processo de desenvolvimento do SNC em humanos se estende do período embrionário até a puberdade e está em constante modificação devido às experiências e exposição a fatores ambientais. O SNC humano possui particularidades e semelhanças em relação ao de outros animais. Em ratos, seu desenvolvimento segue um ciclo de dias, semanas ou meses em relação ao de humanos, mas, mesmo com esta diferença de período de maturação neural, o crescimento das regiões encefálicas entre as duas espécies é semelhante. O fechamento do tubo neural é uma das semelhanças entre as espécies, havendo diferença em relação ao momento em que ocorre: no rato ocorre entre o 10° e 11° dia gestacional; no homem, entre o 26° e 28° dia. A maturação e desenvolvimento do SNC após o fechamento do tubo neural segue o mesmo ciclo, no qual regiões mais caudais (metencéfalo, rombencéfalo e mielencéfalo) se desenvolvem mais cedo que regiões rostrais, tanto em humanos quanto nos ratos. Assim como os humanos, animais também tem um período característico de desenvolvimento do SNC e também estão expostos à neuroplasticidade a partir de experiências ou fatores ambientais (Rice e Barone Junior, 2000).

1.1.1 Desnutrição x Sistema Nervoso Central

A desnutrição é uma das principais causas de mortalidade infantil no Brasil, sendo definida pela Organização Mundial de Saúde 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 intrauterina ou no início da infância, sendo, neste caso, a principal causa, 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). O termo desnutrição significa que um ou mais nutrientes essenciais está ausente da alimentação ou presente em proporções inadequadas. A falta de vitaminas e minerais pode afetar a maturação do SNC, porém, a falta de proteínas se constitui no fator mais crítico para este tipo de alteração (Morgane, Mokler e Galler, 2002).

A prevalência de desnutrição total em crianças menores de 5 anos de idade no Brasil era de 2,8% no período de 2008/2009 (Brasil, 2012). Apesar de parecer uma porcentagem insignificante, corresponde a aproximadamente 470.000 crianças desnutridas, pois, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada pelo IBGE em 2010, o número de crianças de 0 a 5 anos no Brasil até então era de 16.558.666 (Brasil, 2010). Em números, 842 milhões de pessoas no mundo apresentam algum tipo de desnutrição (The State of Food Insecurity in the World, 2013).

A proteína é um nutriente fundamental para a formação de enzimas, anticorpos, hormônios, equilíbrio ácido-básico, transporte de oxigênio, coagulação do sangue e atividade muscular (Neiva e Mello, 1999; Oishi et al., 2002; Wild et al., 2010).

A desnutrição proteica na fase pós-natal promove alterações neurofisiológicas (Lukoyanov e Andrade, 2000; Fukuda, Françolin-Silva e Almeida, 2002) que incluem alterações morfológicas (Díaz-Cintra et al., 1991; Debassio et al., 1996) e neuroquímicas (Alamy et al., 2005) no SNC, comprometendo seu desenvolvimento, interferindo com o surgimento de novas células, migração e diferenciação celular, mielinização e formação de sinapses (Debassio et al., 1994; Lukoyanov e Andrade, 2000).

A desnutrição no início da vida traz impactos negativos à saúde dos indivíduos, sendo que, em curto prazo, pode haver incapacidade, morbidade e morte e, em longo prazo,

alterações da estatura na fase adulta, deficiências nas habilidades intelectuais, alterações na performance reprodutiva, doenças metabólicas e cardíacas, entre outras (Black et al., 2008).

A desnutrição é um dos fatores que pode influenciar a neuroplasticidade, pois proporciona importantes mudanças na organização e reorganização do SNC em humanos, podendo resultar em alterações irreversíveis, principalmente quando ocorrem antes do segundo ano de vida. Os danos principais estão relacionados à neurogênese, migração e diferenciação celular (Vasconcelos, Fazan e Valença, 2009). Em ratos, as principais alterações estruturais causadas ao SNC pela desnutrição são a atrofia ventricular, atraso na mielinização, alterações nos dendritos e na formação de sinapses no hipocampo, alteração na orientação das células piramidais do neocórtex, má formação dos núcleos hipotalâmicos, alterações no córtex somatossensorial. Consequências funcionais são diversas quando a desnutrição proteica está instalada, observando-se alterações relacionadas à cognição, comportamento, déficits visuais e auditivos (Chaudhary et al., 2013).

Considerando que a nutrição no início da vida é uma das principais variáveis relacionadas ao crescimento, formação e organização funcional do organismo, uma dieta inadequada durante o primeiro período da vida pode comprometer o desenvolvimento do SNC, resultando em alterações em sua estrutura e função (Laus et al., 2011). Apesar de um consumo inadequado de carboidratos, lipídeos, vitaminas e oligoelementos poder alterar a estrutura do SNC, o consumo reduzido de proteínas é a maior condição que leva a tais alterações (Morgane et al., 1978; 1992; 1993; 2002).

A desnutrição proteica afeta negativamente o SNC em desenvolvimento, porém as consequências dependem diretamente do tipo, gravidade da privação (grau da desnutrição),

fase (pré ou pós-natal), duração do insulto nutricional e, ainda, da interação com fatores genéticos e ambientais (Laus et al., 2011).

1.2 Aspectos anatômicos do córtex motor

Roedores e humanos apresentam semelhanças no desenvolvimento do córtex cerebral, sendo que em ambos o desenvolvimento ocorre no período fetal, podendo continuar durante um curto espaço de tempo na fase pós natal, com a proliferação de células gliais e microneurônios. Especificamente em relação à estrutura do córtex motor, no rato este é liso e pequeno, enquanto no homem é volumoso devido à alta expansão filogenética do neocórtex (Rice; Barone Junior, 2000).

A seguir, aspectos anatômicos e funcionais do córtex motor, uma das estruturas encefálicas envolvida na plasticidade após lesão nervosa periférica, serão considerados com vistas à compreensão de possíveis adaptações quando a lesão nervosa é associada à condição de desnutrição.

O córtex motor é um analisador cinético e é considerado uma área sensoriomotora. É uma área que recebe, e integra informações sobre motricidade (*inputs*) e envia estímulos para ação muscular para a periferia (*output*) (Rice; Barone Junior, 2000).

De acordo com Brodmann (1909) citado por Funkhouser (1915) e por Mao et al. (2011), o córtex cerebral é dividido em 6 camadas, cada uma com suas características específicas, porém, mantendo uma ligação distinta com as áreas vizinhas. A camada 1 possui poucos neurônios, que apresentam caráter associativo; as camadas 2 e 3 recebem projeções de suas respectivas camadas do córtex sensorial (2 e 3) e possuem fibras de caráter associativo; as camadas 4 e 5 possuem projeções de suas respectivas camadas no córtex sensorial (4 e

5), sendo que a camada 4 possui fibras aferentes e a 5ª camada possui fibras eferentes; a 6ª camada possui alta densidade de fibras de projeção que vão em direção ao tálamo (Mao et al., 2011).

No homem, o córtex motor é dividido em duas regiões: área motora primária (M1) e área motora secundária (M2). O córtex M1 está localizado no terço médio do lóbulo paracentral, região superior do giro pré central e região anterior do sulco central, enquanto o córtex de M2 está localizado na região medial do giro frontal, logo à frente de M1 (Redemacher et al., 1992). Estas áreas são responsáveis diretamente, por exemplo, pela condução de impulsos para a ação muscular dos membros inferiores durante a marcha, e acordo com uma revisão da literatura publicada por Petersen et al. (2012).

Para a coordenação das ações entre os músculos e articulações, a área motora primária decompõe os movimentos em componentes simples com base no mapa corporal. Estes componentes de movimentos são, então, transmitidos para a medula espinal para a execução da ação (Graziano, 2006). Já a área motora secundária possui certas especificidades, como foi observado por Chung et al. (2005), que analisaram, por meio de Ressonância Nuclear Magnética, a área motora secundária de 16 indivíduos e identificaram que esta região tem participação em diversas tarefas funcionais, como por exemplo: motricidade, sensibilidade, fala e memória de tarefas específicas.

O córtex motor do rato, assim como dos primatas, também é composto por uma área motora primária (M1), responsável pelo envio de estímulos referentes à ação muscular, e por áreas motoras suplementares (área motora secundária – M2), responsável por integrar e organizar informações relativas à motricidade (Rice; Barone Junior, 2000).

A 5ª camada cortical foi escolhida para ser analisada neste estudo, por contar com fibras eferentes (Mao et al., 2011) e pela importância da recuperação da funcionalidade após lesão nervosa periférica, analisada neste estudo por meio das adaptações do córtex motor, identificadas pela imunoreatividade de proteínas estruturais. A região do córtex motor primário e secundário que foi analisada neste estudo é a camada piramidal interna, que representa 66% de todas as células do neocórtex. Esta área é “atravessada” por fibras de projeção e de associação, tanto na direção ascendente quanto descendente (Williams et al., 1995).

Na situação de desnutrição proteica, o córtex motor sofre alterações no seu desenvolvimento, o que induz mudanças na maturação do tecido nervoso, as quais podem afetar sua estrutura e funcionalidade (Cordero et al., 1993). De acordo com Cordero et al. (1993), a desnutrição durante o primeiro mês de vida pode afetar o crescimento de células piramidais, especialmente na formação de seus dendritos.

Em estudo que realizou análise histológica do córtex motor de crianças, observou-se que a desnutrição proteica promoveu diminuição da arborização dendrítica das células piramidais do córtex motor primário quando comparado às células da mesma área em crianças não desnutridas (Cordero et al., 1993).

1.2.1 Microtúbulos e Neurofilamentos

Os Microtúbulos (MTs) e neurofilamentos (NFs) são componentes predominantes do citoesqueleto de neurônios maduros (Bunge, 1986).

Os MTs são estruturas instáveis, sendo que as Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAPs) e a Tau tem a importante função de estabilizar estas estruturas e, com isso, manter a

integridade de processos que necessitam de MTs estabilizados, como por exemplo, transporte axonal rápido (Goedert, Crowther e Garner, 1991). A MAP2 é uma vertente estrutural das MAPs, que junto com MAP4 forma a família “clássica” de marcadores em mamíferos. Cada membro da família de MAP2 contém repetidas ligações com microtúbulos através de um terminal carboxílico (Dehmelt e Halpain, 2004). A MAP2 é expressa em mamíferos através dos neurônios, mas possui uma ligação fraca nos percussores neurais, portanto, esta proteína necessita de um período de 24 horas para conseguir agir de uma forma mais consistente na estrutura. Esta proteína é expressa tanto nos estágios de desenvolvimento neural quanto na fase adulta e tem como função se ligar aos MTs, através da alteração do seu comportamento dinâmico (Dehmelt e Halpain, 2004). Outra particularidade dos microtúbulos é sua ligação com proteínas (MAPs) e proteínas *Tau*, que induzem a polimerização e aumentam a sua estabilização na região encefálica (Bunge, 1986), o que sugere um importante papel das MAPs na determinação da morfologia e plasticidade neural (Goedert, Crowther e Garner, 1991).

Os NFs são os maiores componentes do citoesqueleto axonal, estando presentes no SNC e SNP. Estas proteínas são expressas em diferentes tipos de células e tecidos e no SNC, estas são classificadas de acordo com sua densidade: filamentos leves (61 kDa), filamentos intermediários (90 kDa) e filamentos pesados (115 kDa) (Siedler et al., 2014). Os NFs também estão relacionados à manutenção da rede neuronal, conservação da estrutura e plasticidade do citoesqueleto axonal e regulação do potencial de ação do impulso nervoso (Hollenbeck, 1989).

Estruturalmente, NF e MT diferem entre si, pois enquanto o primeiro tem uma disposição descontínua, o segundo começa e termina dentro do próprio axônio, mas nenhum

dos dois acompanha toda a extensão do canal axonal. A figura 1 mostra um exemplo da disposição dos microtúbulos e neurofilamentos na 5ª camada do córtex motor de ratos considerados sedentários no estudo de Garcia et al. (2012).

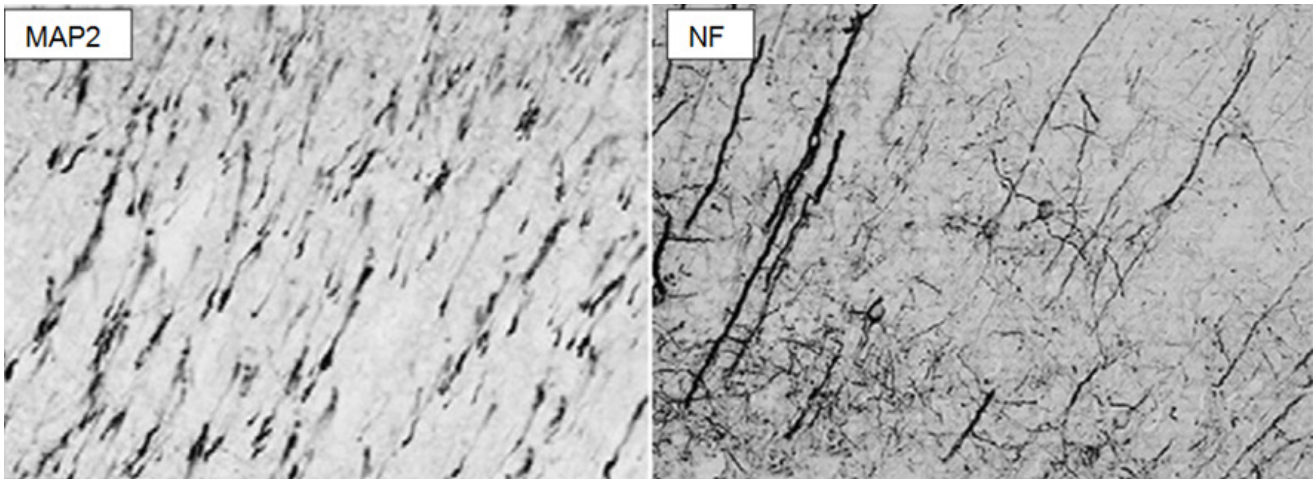


Figura 1: Imagem digital de cortes coronais do córtex motor de animais controle (sedentários), para análise da densidade integrada de MAP2 e NF.
Fonte: Garcia et al. (2012).

1.3 Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Desnutrição

A lesão nervosa periférica é comum na clínica e está geralmente relacionada a uma incapacidade (Gigo-Benato, Geuna e Rochkind, 2005; Gigo-Benato et al., 2010), como perda ou diminuição da sensibilidade e da motricidade no território inervado (Machado, 2000). Tais lesões são frequentemente decorrentes de acidentes automobilísticos e do esporte, seguidos de traumas penetrantes e lesões ao nascimento por tração nervosa excessiva (Ijkema-Paassen et al., 2004).

A lesão nervosa periférica pode acarretar diversas alterações na estrutura e funcionalidade do nervo, podendo estas alterações serem agravadas por situações que prejudiquem a recuperação do nervo como por exemplo, a gravidade da lesão.

A recuperação funcional após lesão nervosa periférica é um desafio para a reabilitação, especialmente nos casos em que o nervo é seccionado, havendo perda de continuidade do tecido. A regeneração nervosa é possível, mas ocorre lentamente (Burnett e Zager, 2004), permanecendo a perda funcional por vários meses (Oliveira et al., 2008), limitando as atividades de vida diária e laborais, além de exigir afastamento do trabalho por tempo prolongado (Lopes, 2000), causar aumento de encargos ao empregador (Burt, 2005), necessidade de mudança de função e, às vezes, aposentadoria precoce (McAllister et al., 1996).

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: 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 mais grave, caracterizada pela ruptura completa do nervo, com conseqüente descontinuidade entre o sistema nervoso central e a periferia, que exige reconstrução cirúrgica.

Um estudo realizado nos EUA mostrou que 50.000 pessoas sofrem lesões traumáticas de nervos a cada ano (Millesi, 2000; Evans, 2001; Gigo-Benato et al., 2010), o que representa um importante problema de saúde pública. No Brasil, o estudo mais atual sobre o assunto, classificou 456 casos de lesão nervosa e mostrou que a axoniotmese era o tipo de lesão mais comum estando presente em 45% da amostra (Kouyoumdjian et al., 2006).

Os mecanismos que envolvem a regeneração do nervo são bem descritos. Quando a continuidade das fibras nervosas é interrompida, o coto nervoso distal sofre degeneração Walleriana (Lundborg, 2005), caracterizada pela desintegração da mielina e dos axônios, com preservação dos núcleos das células de Schwann, que sofrem intensa atividade mitótica e atuam na síntese de fatores tróficos que sustentam a regeneração axonal (Lundborg, 2000). A partir de modificações do corpo celular, com aumento de seu volume, redução da ramificação dendrítica, descentralização do núcleo e aumento da síntese proteica, o coto do axônio proximal pode, então, regenerar ao longo do trajeto do nervo distal e alcançar seu alvo periférico, as fibras musculares e os receptores sensoriais (Lundborg, 2003).

Um dos fatores que podem limitar a regeneração nervosa é a cicatriz que se forma na área da lesão. A barreira cicatricial, na maioria das vezes, impede que as fibras nervosas de um dos cotos encontrem uma passagem para se reconectar ao coto distal, desta forma restringindo ou impedindo o “recrescimento” axonal (Erturk et al., 2007).

Tanto a lesão nervosa periférica quanto a central possuem suas particularidades em relação à expressão da MAP2: nas lesões do SNC as alterações na expressão de MAP2 ocorrem dentro da primeira semana, enquanto nas lesões do SNP tais alterações ocorrem após a primeira semana (Book et al., 1996).

Além de consequências nas estruturas periféricas, uma lesão no nervo resulta numa reorganização em níveis corticais e subcorticais (Chen, Cohen e Hallett, 2002; Lundborg, 2000; 2003). Esta reorganização é prolongada, inicia logo após a lesão e inclui diversos mecanismos que auxiliam na recuperação, mas o resultado final é sempre incompleto (Erturk et al., 2007).

Observações clínicas indicam que o SNC apresenta capacidade considerável para reorganização funcional, dispondo de mecanismos compensatórios úteis nos casos de cegueira, acidente vascular encefálico e lesão nervosa periférica (Bach-y-Rita, 1990). Merzenich e colaboradores identificaram evidências neurofisiológicas de reorganização do córtex somatossensorial de primatas adultos, que podem ser induzidas por modificações na experiência sensorial e performance da mão ou por diferentes tipos de deafferentação, como amputação ou lesão nervosa periférica (Merzenich et al., 1978; Merzenich et al., 1983; Merzenich et al., 1984; Merzenich; Nelson; Kaas, 1987). Após uma transecção nervosa experimental do nervo mediano em primatas, informações aferentes não são recebidas nas áreas de projeção correspondentes aos dedos. Como resultado da plasticidade cerebral, estas áreas rapidamente se tornam “ocupadas” por *inputs* táteis de áreas adjacentes, que permanecem inervadas por outro nervo (Lundborg, 2000).

Assim como o córtex somatossensorial, o córtex motor também pode reorganizar rapidamente sua representação em resposta à lesão nervosa periférica ou bloqueio isquêmico do nervo (Sanes et al., 1988; Donoghue et al., 1990; Brasil-Neto et al., 1992, 1993; Ziemann et al., 1998) ou durante a prática motora (Classen et al., 1998; Bütefisch et al., 2000) ou aprendizado motor (Pascual-Leone et al., 1994; 1995). Os estudos citados incluem ratos e humanos.

A plasticidade após a lesão se deve, principalmente, ao desmascaramento de sinapses não funcionais, responsáveis pela expansão adjacente, tanto cortical quanto subcortical após deafferentação. Logo após a lesão nervosa periférica são desencadeados processos inibitórios e neuromodulatórios nas regiões corticais e subcorticais, sendo uma das principais alterações fisiológicas a inibição de sinapses excitatórias por meio da diminuição do nível de inibidores do ácido gama amino butírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC, caracterizando a fase inicial deste processo. As alterações relacionadas a este neurotransmissor podem durar meses, sugerindo sua extrema importância para a manutenção da representação cortical do território inervado pelo nervo lesado (Lundborg, 2003).

A desnutrição pode gerar alterações no desenvolvimento do sistema nervoso periférico, podendo modificar tanto a morfologia e funcionalidade dos nervos.

No SNP de ratos, Hedley-Whyte (1973) observou atraso na mielinização de axônios após desnutrição pós natal. Já Delaney et al. (1981) não encontraram diminuição significativa na mielinização dos axônios em animais desnutridos, mas o número de fibras mielinizadas no grupo desnutrido era 40% menor que no controle, sugerindo que este resultado se deve a uma “falha” no estímulo de células formadoras de mielina, devido à desnutrição. Mais recentemente, Segura et al. (2001) observaram que a desnutrição perinatal (6% de proteína) causa redução na amplitude, área e velocidade do potencial de ação, além de diminuição da espessura da bainha de mielina no SNP de ratos, porém não altera o número ou o diâmetro dos axônios. Em estudo desenvolvido por Kitamura (2013), ratos tratados com dieta 6% de proteína no período pós natal (do 21º ao 66º dia de vida) tiveram redução significativa da espessura da bainha de mielina, no diâmetro dos axônios e no diâmetro das fibras nervosas no nervo isquiático, sem alteração no número de axônios, quando comparados a animais que

receberam nutrição normal (dieta 14% de proteína). Entretanto, não foram encontrados estudos que relatassem sobre as respostas do SNC à lesão nervosa periférica na condição de desnutrição.

1.4 Justificativa

Considerando que a desnutrição pode promover alteração da conformação das proteínas associadas aos neurofilamentos e microtúbulos no córtex motor de ratos, a reação destas proteínas com anticorpos específicos ficaria comprometida na condição experimental proposta neste estudo, reduzindo sua imunorreatividade.

Nesse sentido, torna-se importante analisar o efeito da desnutrição e da desnutrição associada à lesão nervosa periférica, assim como compreender os mecanismos de reparo nestas condições.

Os dados deste estudo poderão subsidiar futuras investigações sobre as respostas fisiológicas que visam à aceleração da regeneração nervosa periférica e recuperação funcional em animais e humanos.

1.5 Hipótese

A associação entre lesão nervosa periférica e desnutrição prejudicaria a reorganização dos neurofilamentos e microtúbulos dos neurônios corticais durante a regeneração nervosa periférica, o que poderia comprometer a recuperação da lesão.

2. OBJETIVO

Geral

Avaliar as adaptações do córtex motor de ratos por meio de análise qualitativa e quantitativa da imunorreatividade de proteínas estruturais na condição de axoniotmese e de desnutrição.

Específicos

- Quantificar a massa corporal dos animais nos diferentes grupos;
- Avaliar a imunorreatividade da proteína associada aos neurofilamentos (PAN) nas áreas M1 e M2;
- Avaliar a imunorreatividade da proteína associada aos microtúbulos (MAP2) nas áreas M1 e M2.

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), sob protocolo nº 02/2014 (ANEXO 1) –

3.2 Grupos Experimentais e Composição das Dietas

Ratos da linhagem *Wistar* foram divididos em 4 grupos (n=4): Controle Nutrido - CN; Controle Desnutrido - CD; Lesado Nutrido - LN; Lesado Desnutrido - LD.

Neste estudo não foi incluído um grupo Sham, pois dados obtidos pelo grupo de pesquisa em estudos anteriores (Teodori et al., 2011) mostraram que a exposição cirúrgica do nervo isquiático, sem que seja realizada a lesão, não alterou as características morfológicas do nervo isquiático em animais normalmente nutridos, o que implicaria na ausência de alterações relacionadas à morfologia das áreas motoras corticais.

Os grupos CN (45 dias nutrição) e LN (66 dias de nutrição) foram tratados com dieta normoproteica, composta por 14 % de proteína (AN93M-14% proteína) e os grupos CD (45 dias de desnutrição) e LD (66 dias de desnutrição) receberam dieta hipoproteica (desnutrição), com 6 % de proteína (AN-6% proteína), de acordo com Reeves, Nielsen e Fahey Jr (1993). As dietas foram obtidas de Prag Soluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE: 401.091.476.112-ME (composição descrita na tabela 1).

Tabela 1: Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição.

Dieta AN 93 M -14% proteína (ingredientes para 1 Kg)		Dieta AN - 6% proteína (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).

3.3 Tratamento Nutricional

O protocolo de alimentação dos ratos teve início no 21º dia pós natal. Os ratos do grupo CN foram alimentados com ração normoproteica por 45 dias, sendo realizada a eutanásia no 46º dia; os ratos do grupo CD foram alimentados com ração hipoproteica por 45 dias, sendo realizada a eutanásia no 46º dia; os ratos do grupo LN foram alimentados com ração normoproteica por 45 dias, no 46º tiveram o nervo isquiático esmagado e permaneceram por 21 dias com dieta normoproteica, sendo eutanasiados no 66º dia; os ratos do grupo LD foram alimentados com ração hipoproteica por 45 dias, no 46º dia tiveram o nervo isquiático esmagado e permaneceram por 21 dias com dieta hipoproteica, sendo eutanasiados no 66º dia.

O protocolo de desnutrição utilizado neste estudo é idêntico ao utilizado por Pezolato et al. (2013).

A figura 2 resume os períodos de desnutrição, lesão nervosa e coleta dos encéfalos nos diferentes grupos estudados.

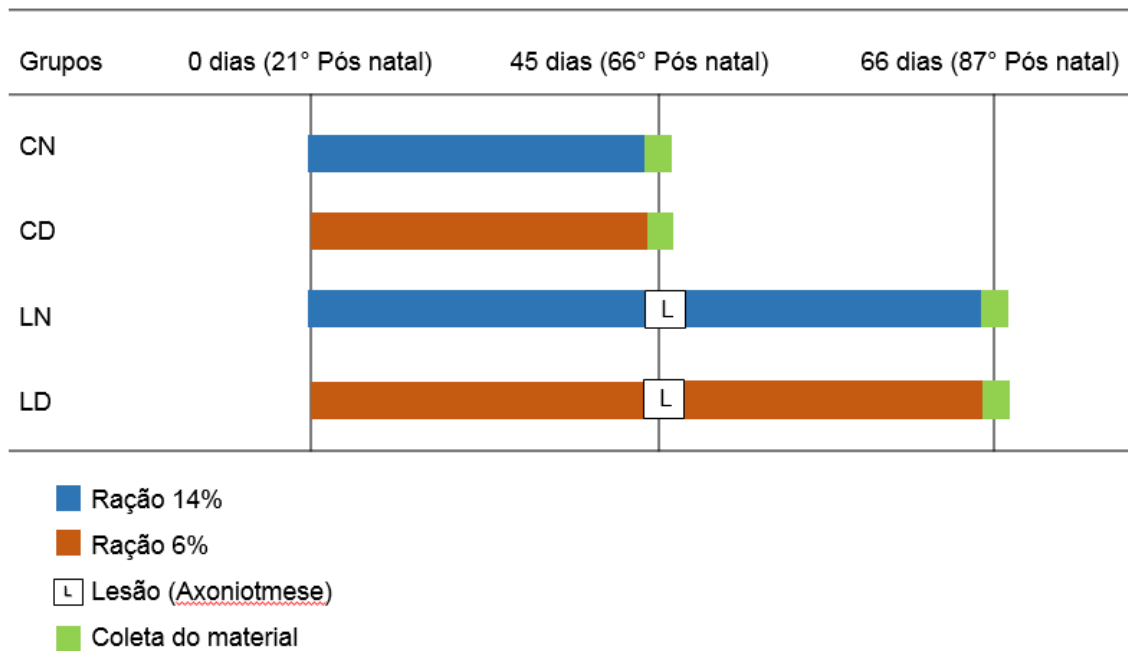


Figura 2: Cronograma de desnutrição, lesão nervosa e coleta do encéfalo nos animais dos grupos Controle Nutrido (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Nutrido (LN), Lesado Desnutrido (LD).

3.4 Massa corporal

O experimento teve início quando os animais alcançaram 21 dias de vida, época do desmame. Neste momento, foi realizada a primeira aferição de massa corporal, que foi repetida semanalmente até a data da coleta de material, utilizando-se uma balança digital para ratos (Gehaka ® - modelo BG 1000).

3.5 Lesão Nervosa Periférica

Para a lesão do nervo isquiático, os ratos dos grupos LN e LD foram anestesiados com 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 e 0,06 mL/100 g de peso 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 de 12 cm (Erwin Guth[®]), com as extremidades protegidas por esparadrapo, para evitar que as serrilhas causassem interrupção do epineuro. A uma distância de 5 mm proximal ao ponto de ramificação do nervo isquiático, foram realizados quatro pinçamentos com duração de 20 segundos e intervalo de um segundo entre eles, de acordo com Fernandes et al. (2005). A figura 3 mostra o aspecto anatômico do nervo imediatamente após o esmagamento.



Figura 3: Imagem macroscópica do nervo após o esmagamento. Observa-se a presença de lesão axonal sem ruptura dos envoltórios conjuntivos.

Ao término desse procedimento, os planos muscular e cutâneo foram fechados com fio de sutura Ethicon 6-0. Posteriormente os ratos foram mantidos em gaiolas de polietileno, submetidos a ciclo/escuro de 12 horas e livre acesso à ração (de acordo com o grupo experimental) 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, a cada 12 horas, com efeito analgésico (Takeda et al., 2008).

3.6 Coleta do material e protocolo de imuno-histoquímica.

Os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 2% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 2% por 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB. Após no mínimo 24

horas, os tecidos foram cortados com espessura de 40 μm em micrótomo deslizante de congelamento. Os cortes histológicos foram colocados em placa de cultivo, em solução *anti freezing* (anti congelamento), e mantidos em geladeira a 4 $^{\circ}\text{C}$ até o momento do procedimento de imuno-histoquímica. Os cortes contendo o córtex motor (primário e secundário) foram selecionados e submetidos à metodologia de imuno-histoquímica com anticorpos primários específicos. MAP2 (anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra a proteína MAP2 – Chemicon Temecula, CA, EUA) na concentração de 1:500 e neurofilamentos (anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra NFs – Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EUA) na concentração de 1:500. Os cortes foram lavados em tampão fosfato (PB 0,1 M) por seis vezes de 10 minutos para cada lavagem, e foram então incubados com anticorpos primários específicos em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal do animal que foi produzido o secundário, ou seja, soro normal de cabra (*normal goat serum* – NGS). Os cortes foram incubados por um período de 14 a 18 horas à temperatura ambiente (24 $^{\circ}\text{C}$) (Garcia et al., 2012).

Os cortes foram lavados novamente, três vezes com duração de 10 minutos para cada lavagem, em tampão fosfato à temperatura ambiente e incubados por duas horas com anticorpo secundário biotilado contra as imunoglobulinas do animal no qual foi feito o anticorpo primário, ou seja, anti-camundongo feito em cabra (α -ms gt b) em uma concentração de 1:200. Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os cortes foram colocados por duas horas numa solução de Triton X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M com 0,4 M de NaCl, contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector Labs., Burlingame, CA, EUA), preparada 30 minutos antes da incubação. Após nova série de lavagens (3 lavagens com duração de 10 minutos cada), os cortes foram imersos num meio

contendo 3-3'diaminobenzidina (DAB-Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) 0,05% em tampão fosfato 0,1 M por 5 minutos. Foram acrescentados 3 ml de uma solução de H₂O₂ a 0,1% em água destilada, mantendo-se os cortes neste banho até que a reação fosse evidenciada. Atingida a imunorreatividade desejada com o desenvolvimento de coloração marrom, os cortes foram removidos da solução com DAB e imersos em tampão PB 0,1 M. Depois de nova série de lavagens (seis lavagens com duração de 10 minutos cada) em tampão fosfato 0,1 M com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e colocadas em placa quente, e após secarem foram hidratadas em água destilada por 1 minuto, fixados em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 1 minuto, hidratadas novamente em água destilada e desidratadas por uma série de álcoois em concentrações crescentes, clareadas com Hemo-De (Fisher) e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount (Sigma) (Garcia et al., 2012). Para análise semiquantitativa foram capturadas imagens digitais em microscópio óptico (E1000, Nikon) acoplado a uma câmera digital e ao programa Nikon Imaging Software ACT-U. Foram obtidas imagens do córtex de 4 animais de cada grupo. A imunorreatividade foi analisada em microscópio de luz e quantificações da marcação foram realizadas com o programa Image J (NIH).

No córtex motor foram selecionadas as áreas motora primária (M1) e motora secundária (M2), bilateralmente, utilizando-se de 5 cortes encefálicos (10 áreas corticais). Estas áreas foram analisadas por estarem envolvidas diretamente com a execução e planejamento motor, respectivamente, sendo analisada a camada V e suas imediações, uma vez que esta camada contém células eferentes do córtex. As regiões de interesse foram identificadas com base no Atlas: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos e Watson,

2005), sendo o córtex motor analisado entre 2.52-1.56 da área de bregma. Em seguida, realizou-se a quantificação da densidade integrada da marcação de cada área, utilizando-se um quadrado de $235.872 \mu\text{m}^2$. Foi realizada a média bilateral dos córtices M1 e M2 e com os valores das médias fez-se uma razão (média da densidade integrada dos hemisférios cerebrais, independente do grupo) obtendo-se um valor final para cada animal.

A Densidade integrada, dos microtúbulos e neurofilamentos associados a proteína, reflete a quantidade de pixels de cada imagem, a qual é transformada em valor numérico pelo programa Image J.

A figura 4 destaca, no quadro vermelho, a representação da região do Córtex motor primário (M1) e secundário (M2), áreas onde foi analisada a densidade integrada da marcação.

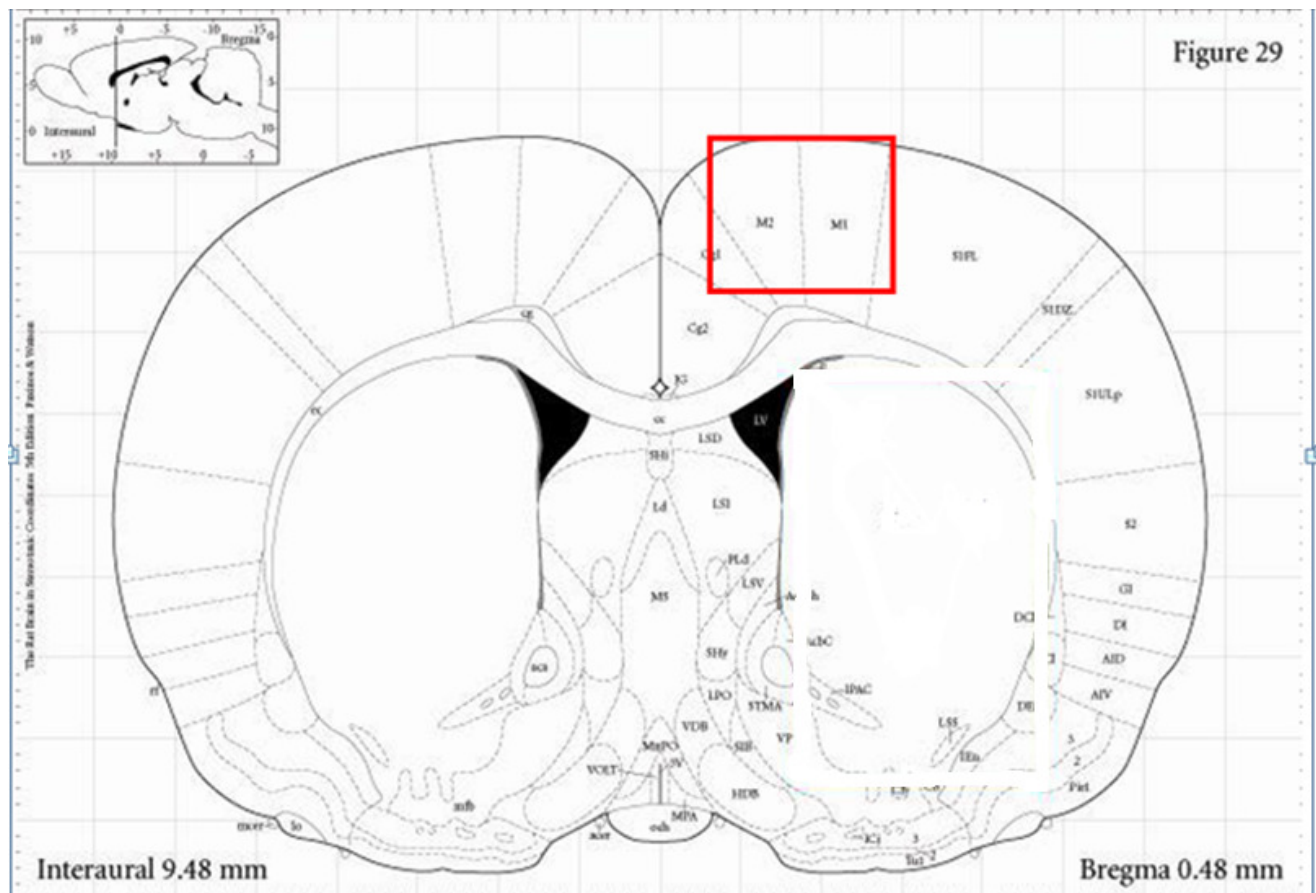


Figura 4 - Esquema Ilustrativo do encéfalo de ratos destacando a região do córtex motor (M1 e M2). Imagem obtida de: "The rat brain – In Stereotaxic Coordinates – George Paxinos e Charles Watson". Elsevier Academic Press, 2005.

3.7 Procedimentos para obtenção dos dados

Como não foi realizada a marcação do lado experimental dos grupos lesados no momento da coleta, após a análise quantitativa, os lados experimentais foram identificados através da diferença da imunorreatividade das proteínas na análise da densidade integrada. O lado com valores menores de densidade integrada de MAP2 e PAN foi identificado como sendo o lado experimental deste estudo, considerando que a literatura aponta uma adaptação nas áreas corticais contralaterais à lesão nervosa periférica (Lundborg, 2000; 2003).

3.8 Análise Estatística

Os dados referentes à massa corporal foram submetidos ao Teste T para análise da normalidade e posteriormente, ao teste Anova (um critério) para análise da significância entre os grupos. Para a análise das diferenças de densidade integrada bilateral entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para estas análises, utilizou-se o programa Biostat 5.3.

Para análise de diferenças de densidade integrada unilateral foi utilizado o programa GraphPad Prism 3.0, aplicando-se o teste de Anova (um critério) seguido de Tukey.

Todos os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão, considerando-se o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Massa corporal

Os dados relacionados à massa corporal dos animais nos diferentes grupos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Média \pm DP da massa corporal dos animais dos grupos Controle Nutrido (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Nutrido (LN) e Lesado Desnutrido (LD).

Grupo	Massa Corporal (g)
CN (45 dias)	239,84 \pm 16,12
CD (45 dias)	92,80 \pm 24,53*
LN (66 dias)	353,90 \pm 27,80
LD (66 dias)	125,65 \pm 24,95**

* Difere do CN ($p < 0,01$); ** Difere do LN ($p < 0,01$). Teste T seguido de Anova One Way.

A massa corporal do grupo CD foi 61,31 % menor em relação à do grupo CN. Para os animais submetidos à lesão nervosa, o grupo LD apresentou massa corporal 64,5 % menor em relação ao grupo LN.

A evolução da massa corporal dos ratos de cada grupo foi mensurada semanalmente e os dados estão apresentados no gráfico 1.

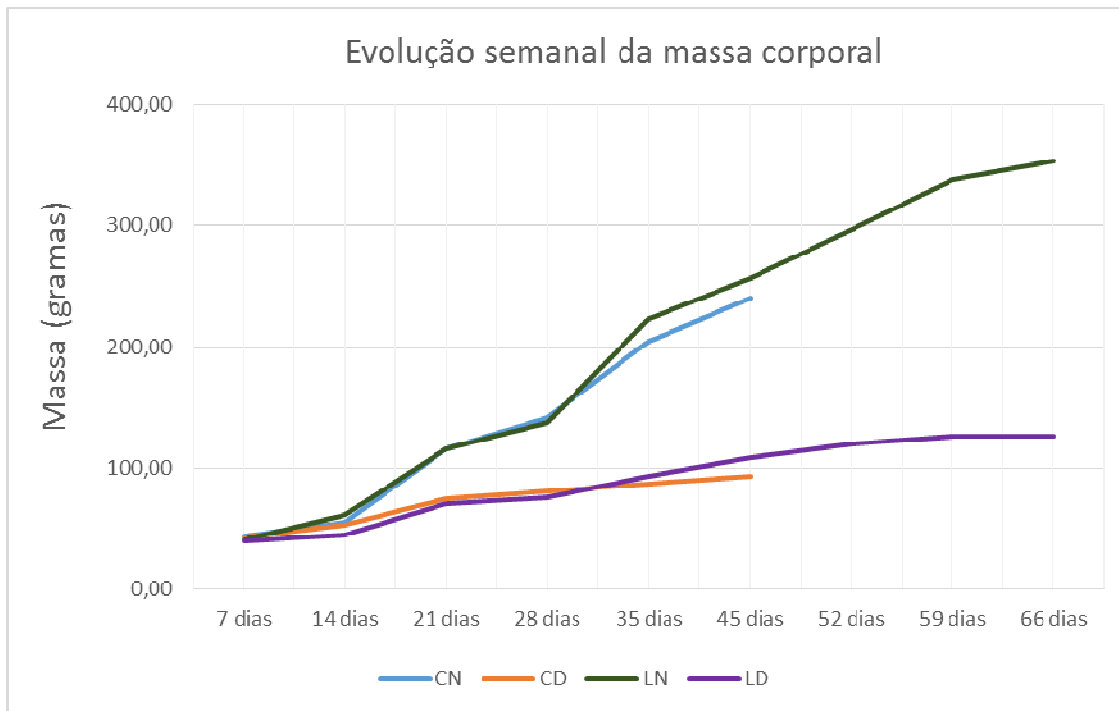
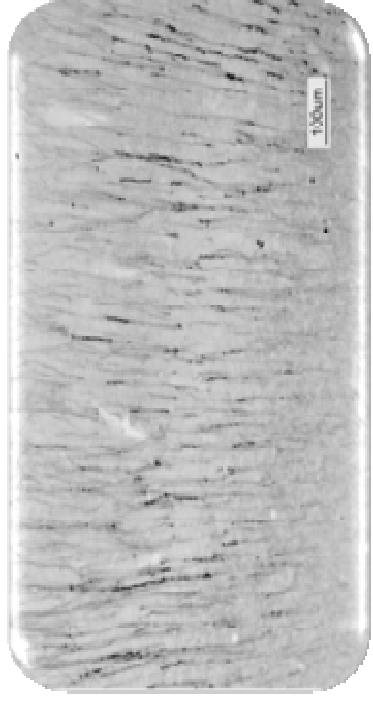


Figura 5: Valores médios da massa corporal, dos animais dos grupos Controle Nutrido (CN), Controle Desnutrido (CD), Lesado Nutrido (LN) e Lesado Desnutrido (LD), semanalmente.

4.2 Imunorreatividade das Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAP2) e aos Neurofilamentos (PAN)

4.2.1 Grupos Controle – MAP2

A densidade integrada de MAP2, foi quantificada pela imunorreatividade desta proteína, foi menor no grupo CD quando comparado ao grupo CN, tanto no córtex motor primário (M1 – 73% menor) quanto no secundário (M2 – 74 % menor), conforme mostra a figura 6.



M2 – CD

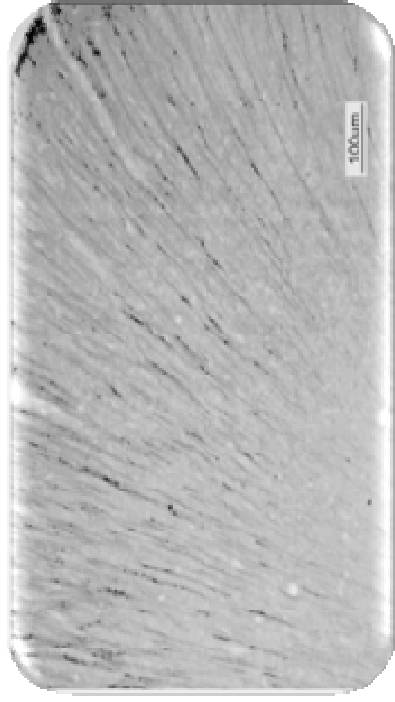
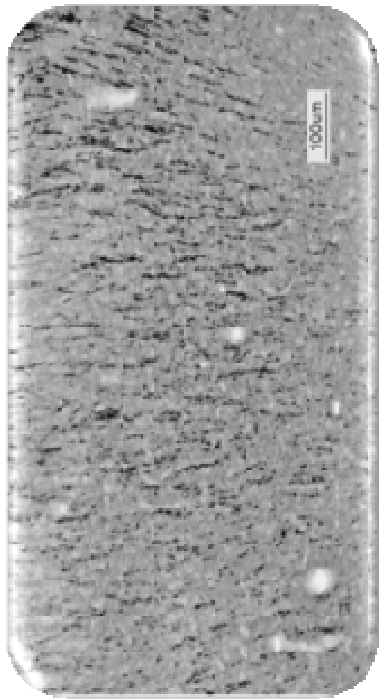
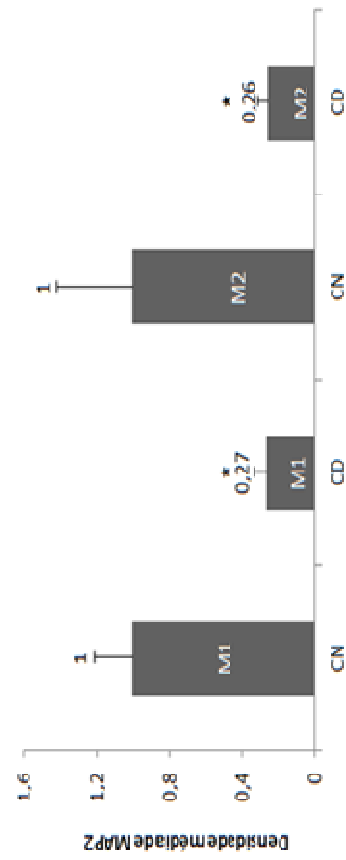
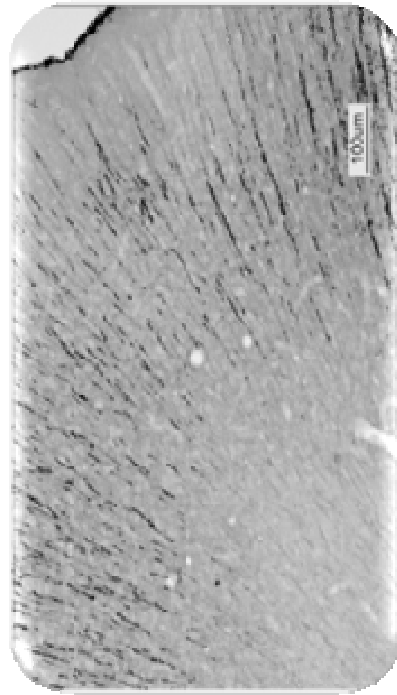


Figura 6 – Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP da densidade integrada de proteína associada aos microtúbulos (MAP2) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD) nos áreas motoras primária (M1) e secundária (M2).

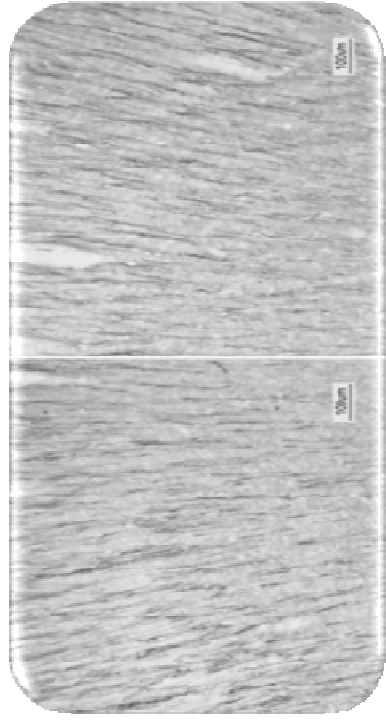


M2 – CN



Além da análise bilateral dos córtices (M1 e M2), foram realizadas as análises unilaterais para constatar a semelhança de densidades integradas nos córtices motores primários e secundários dos grupos controle. Os resultados são apresentados na figura 7.

M1 – CD



M2 – CD

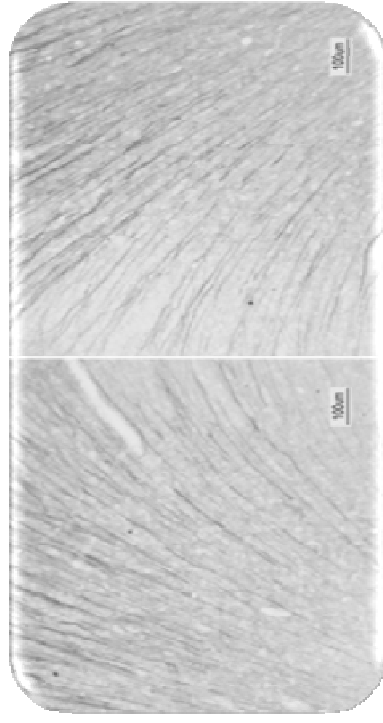
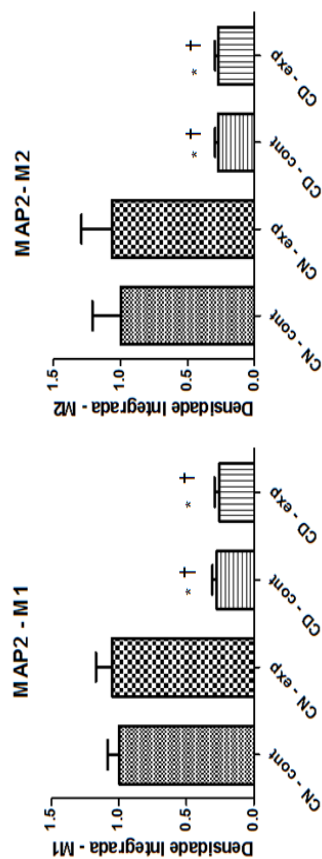
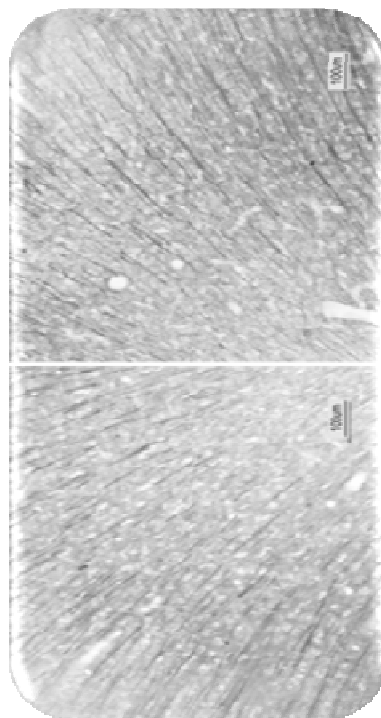
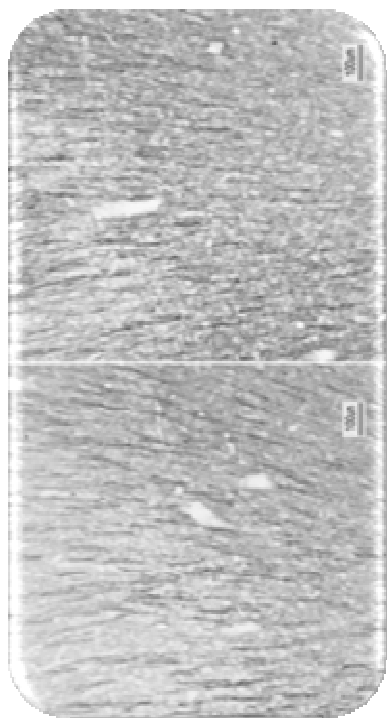


Figura 7 – Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP da densidade integrada de proteína associada aos microtúbulos (MAP2) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2), nos hemisférios esquerdo (controle) e direito (experimental).

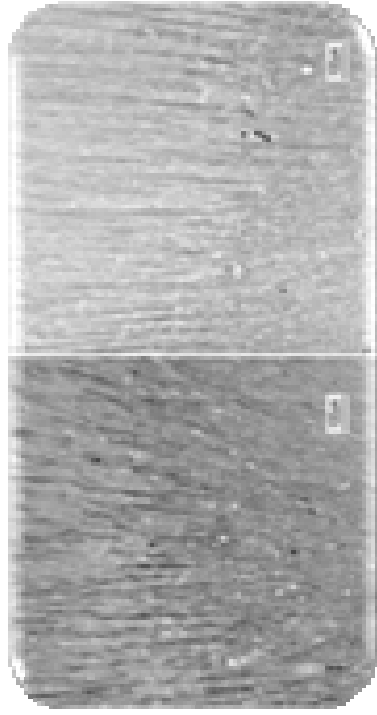


4.2.2 Grupos Submetidos à Axoniotmese – MAP2

Grupos Lesão

A imunorreatividade da proteína MAP2 foi menor no grupo LD quando comparado ao grupo LN, tanto no córtex motor primário (M1 - 71% menor) quanto no secundário (M2 – 70% menor), conforme mostra a figura 8.

M1 – LD



M2 – LD

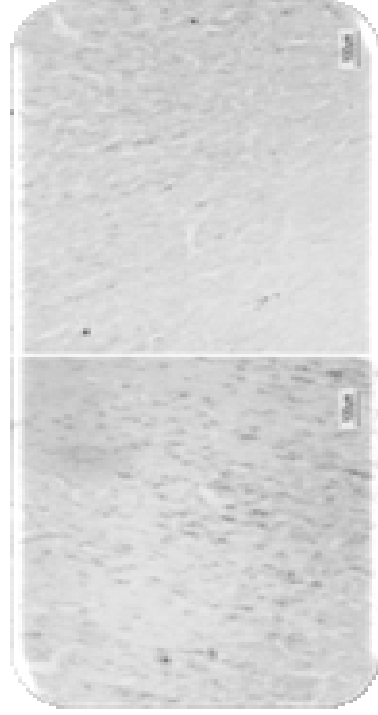
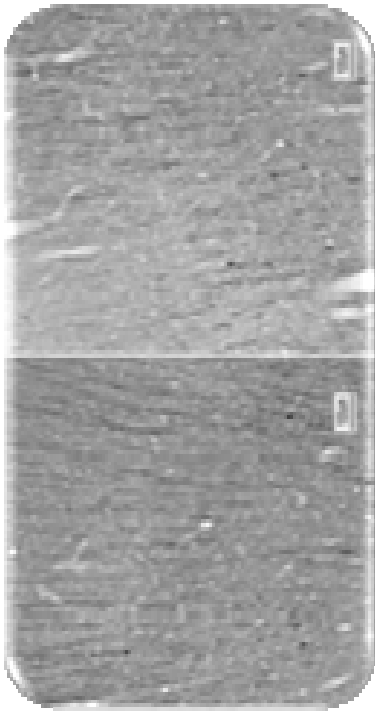
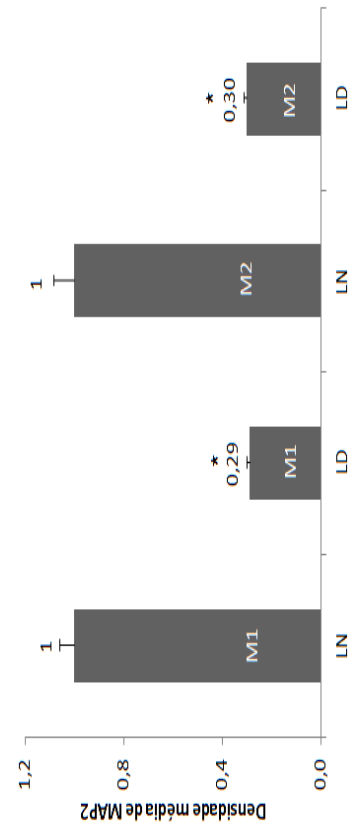
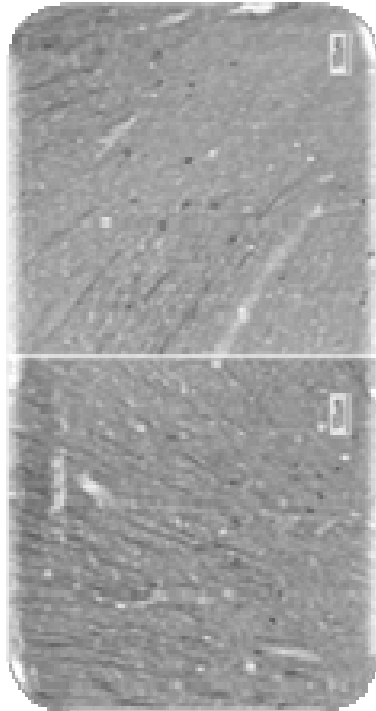


Figura 8 – Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP e micrografias da densidade integrada de proteína associada aos microtúbulos (MAP2) nos grupos Lesado Nutrido (LN) e Lesado Desnutrido (LD), nas áreas

M1 – LN



M2 – LN



A análise unilateral da imunorreatividade de MAP2 nos córtices motores primários e secundários também foi realizada nos grupos submetidos à axoniotmese, conforme mostra a figura 9.

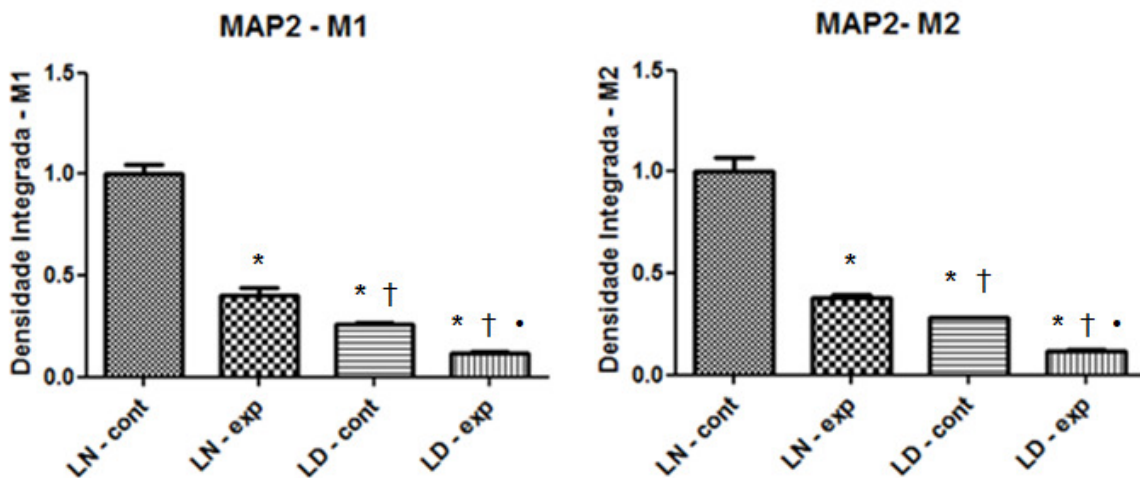


Figura 9 – Imagens ilustrativas do córtex motor e valores médios \pm DP da densidade integrada de proteína associada aos microtúbulos (MAP2) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2), nos hemisférios esquerdo (controle) e direito (experimental).

* Difere do LN-cont. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$);

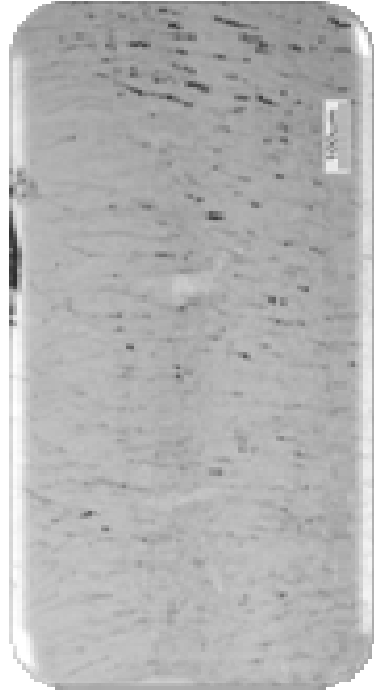
† Difere do LN-exp. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$);

• Difere do LD-cont. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$).

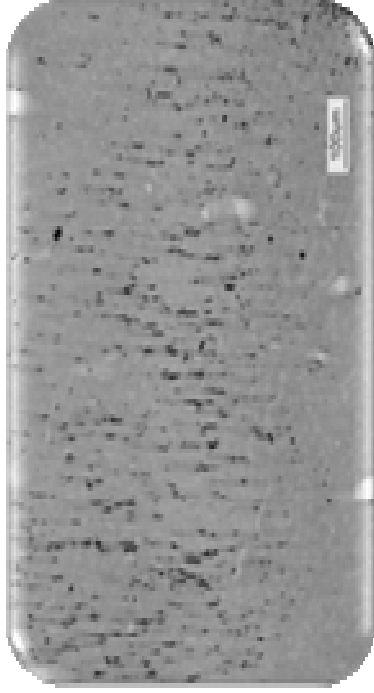
4.2.3 Grupos Controle – PAN

A densidade integrada de PAN, bilateral, visualizada pela imunorreatividade desta proteína, foi menor no grupo CD quando comparado ao grupo CN, tanto no córtex motor primário (M1 – 87% menor) quanto no secundário (M2 – 85% menor), conforme mostra a figura 10.

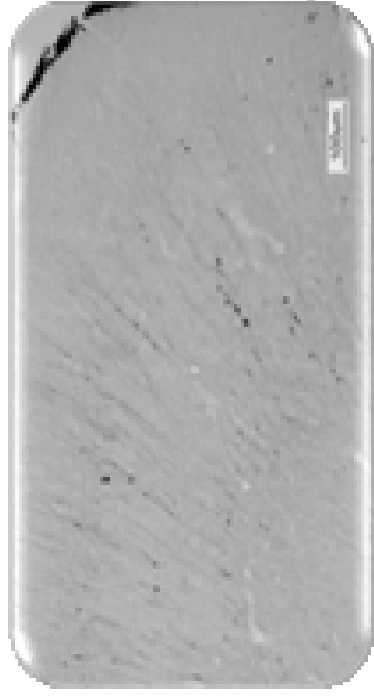
M1 – CD



M1 – CN



M2 – CD



M2 – CN

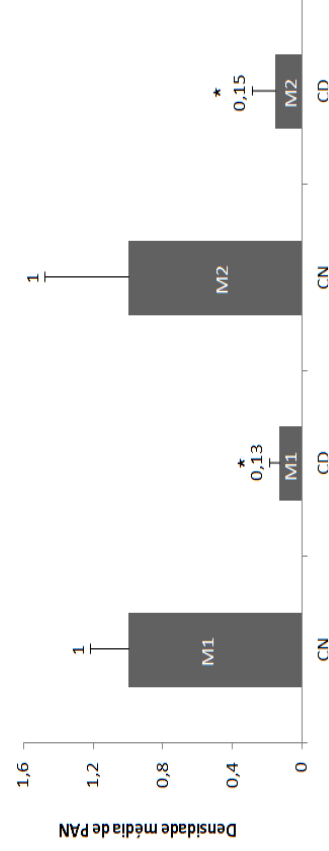
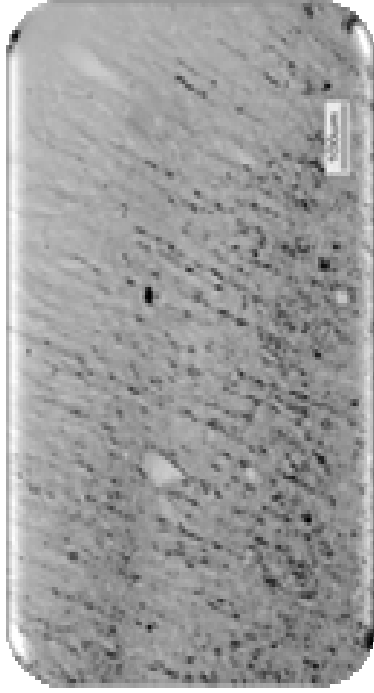
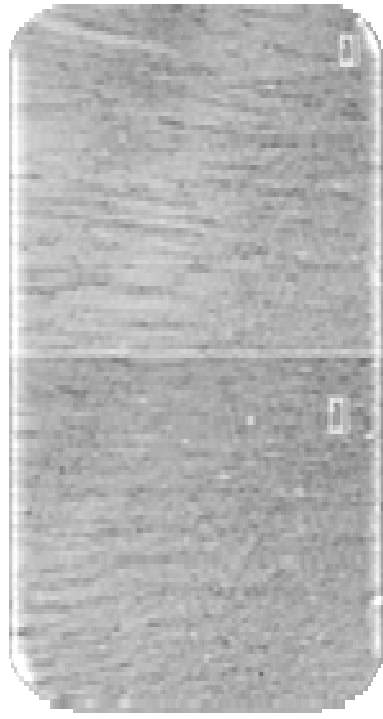


Figura 10 – Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP da densidade integrada da proteína associada aos neurofilamentos (PAN) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2).

* Difere do respectivo CN. Teste de Mann Whitney ($p = 0,02$).

Os resultados referentes à análise unilateral da densidade integrada de PAN nos lados controle e experimental dos grupos CN e CD estão apresentados na figura 11.

M1 – CD



M2 – CD

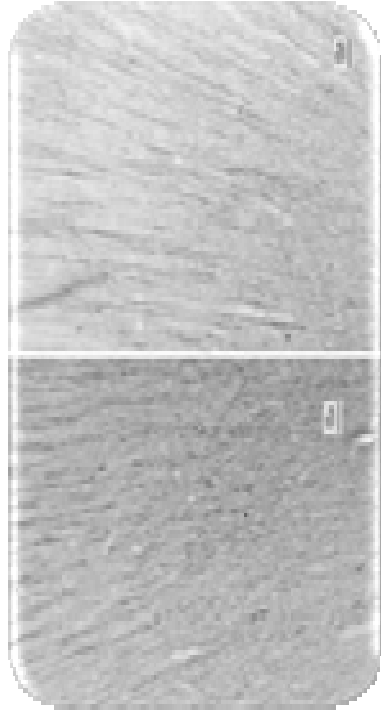
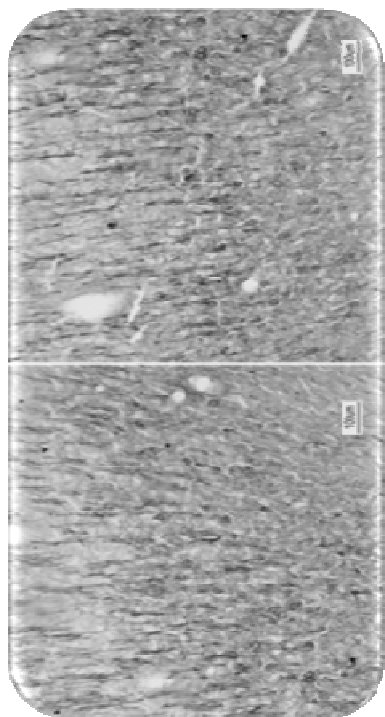
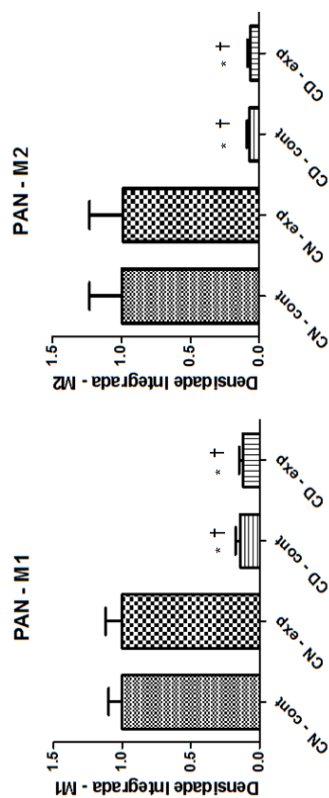
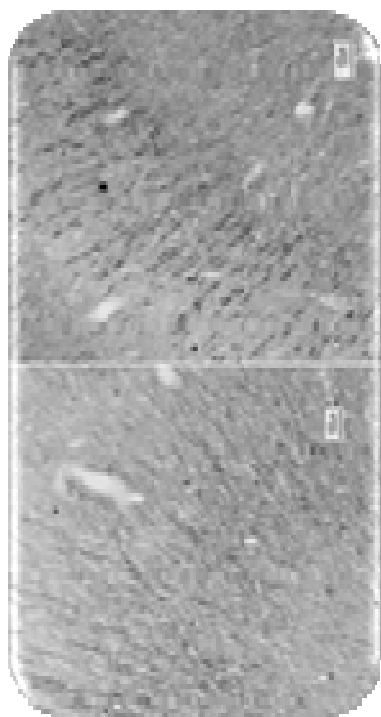


Figura 11 – Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP da densidade integrada de proteína associada aos neurofilamentos (PAN) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2), nos

M1 - CN



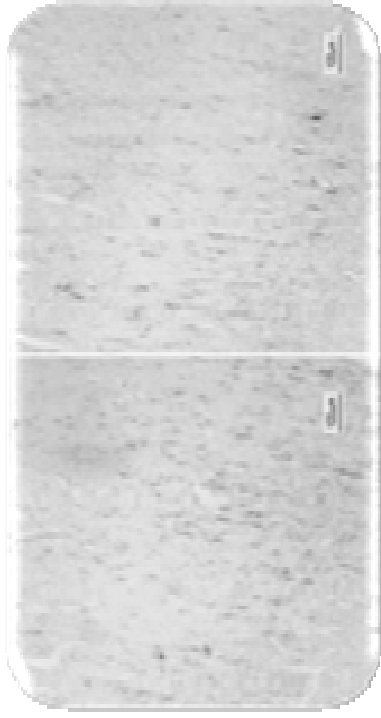
M2 - CN



4.2.4 Grupos Submetidos à Axoniotmese – PAN

A imunorreatividade da proteína PAN, foi menor no grupo LD quando comparado ao grupo LN, tanto no córtex motor primário (M1 – 81% menor) quanto no secundário (M2 – 81% menor), conforme mostra a figura 12.

M1 - LD



M2 - LD

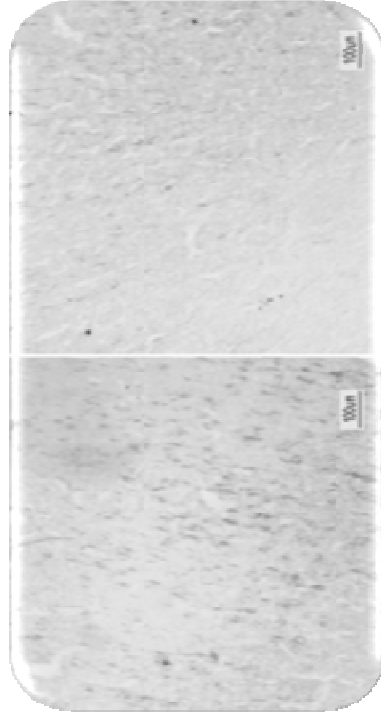
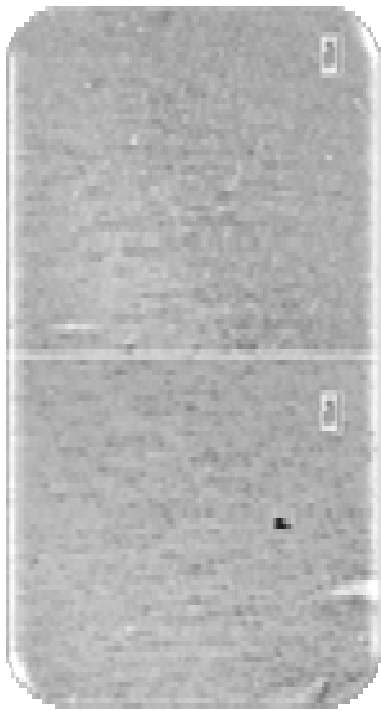
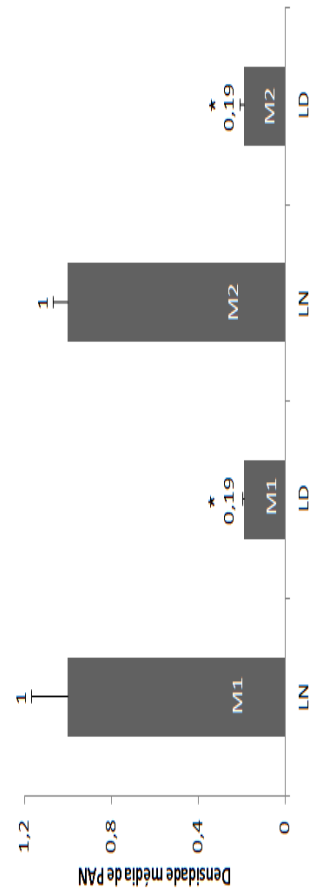
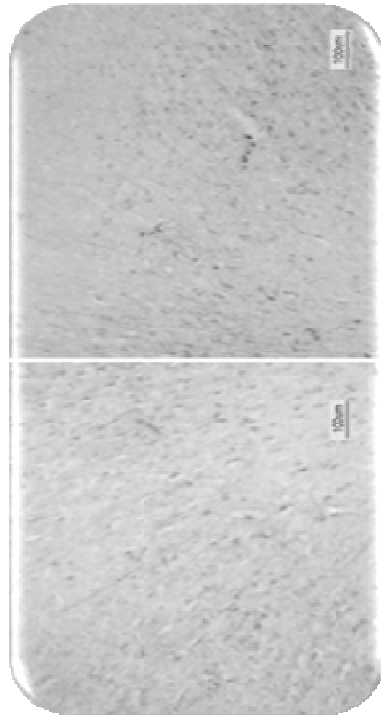


Figura 12 - Imagens digitais do córtex motor e valores médios \pm DP e micrografias da densidade integrada de proteína associada aos neurofilamentos (PAN) nos grupos Lesado Nutrido (LN) e Lesado Desnutrido (LD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2).

M1 - LN



M2 - LN



Os valores de densidade integrada de PAN, unilateralmente, nos grupos submetidos à axoniotmese estão apresentados na figura 13.

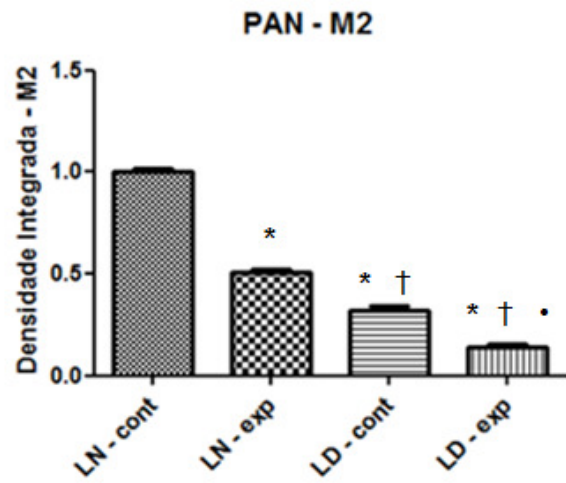
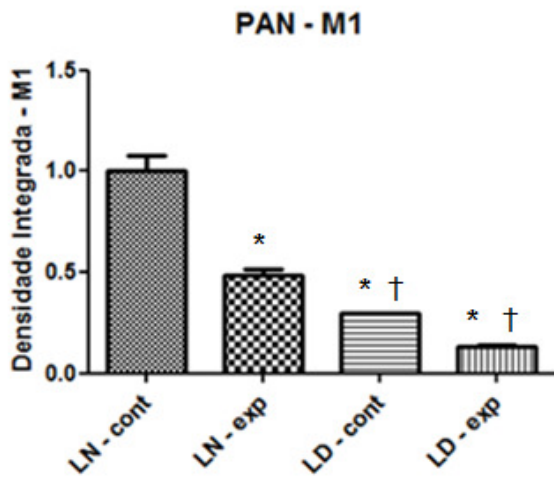


Figura 13 – Valores médios \pm DP da densidade integrada de proteína associada aos neurofilamentos (PAN) nos grupos Controle Nutrido (CN) e Controle Desnutrido (CD), nas áreas motoras primária (M1) e secundária (M2), nos hemisférios esquerdo (controle) e direito (experimental).

* Difere do LN-cont. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$);

† Difere do LN-exp. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$);

• Difere do LD-cont. Anova One Way seguido de Tukey ($p=0,0001$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Modelo Experimental

O modelo experimental de desnutrição proteica após o desmame é um dos que melhor reflete a realidade de nossa população de crianças, as quais, frequentemente experimentam desnutrição proteica e calórica durante os primeiros 2 anos de vida, com início logo após o desmame (Nunes et al., 2002).

A utilização do rato como modelo experimental se deve ao fato de haver uma analogia genética de 80% entre ratos e humanos, sendo os ratos animais ideais para estudos envolvendo análises fisiológicas, anatômicas, de comportamento, entre outras. (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Além disso, mais de 80% dos estudos com experimentação animal são realizados em roedores, principalmente em ratos (Sengupta, 2013).

5.2 Dieta Hipoproteica

As dietas normoproteica (AN 93M – 14%) e hipoproteica (NA – 6%), propostas por Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993) e utilizadas neste estudo, diferem apenas no conteúdo proteico e foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição. Ambas as dietas apresentam equilíbrio de nutrientes e são adequadas para roedores. A fonte de proteína utilizada foi a caseína, adequando-se os valores normais recomendados pelos autores.

Estudo realizado por Fukuda, Françolin-Silva e Almeida (2002) também utilizou dieta com 6% de caseína no período de lactação e após desmame, até o 49^o dia de vida,

observando sua efetividade pela redução de 40% da massa corporal dos animais em relação àqueles que receberam dieta normal.

Apesar da variação na porcentagem de proteína nas dietas consideradas hipoproteicas (5 a 10%) e normoproteicas (14 a 24%) identificadas na literatura consultada (Araújo et al., 2003; Merino-Sanjuán et al., 2011; De Belchior et al., 2012; Ohishi et al., 2012; Rinaldi et al., 2013; Da Silva et al., 2013; Chaudhary et al., 2013), optou-se neste estudo pela dieta proposta por Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993), considerando o equilíbrio de nutrientes, a adequação a roedores e os estudos que utilizaram a mesma porcentagem de proteínas em dieta hipoproteica, alcançando os objetivos de desnutrir os animais experimentais (Pezolato et al., 2013; Kitamura, 2013).

5.3 Massa Corporal

A ração aplicada neste estudo é hipoproteica/isocalórica, tendo diminuição apenas no nível de caseína em relação à ração normoproteica (Reeves; Nielsen; Fahey Jr., 1993).

A desnutrição proteica aplicada no início da fase pós natal interfere no desenvolvimento da massa corporal. Estes achados foram observados por Fukuda, Françolin-Silva e Almeida (2002), que acompanharam filhotes de ratos desde o nascimento até o 49º dia de vida, submetidos a dieta contendo 6% de caseína. Os animais apresentaram massa corporal 40% menor quando comparados ao grupo que consumiu ração contendo 16% de proteína (dieta normoproteica).

Já no estudo de Pezolato et al. (2013) o grupo desnutrido, tratado por 45 dias com a mesma dieta utilizada neste estudo, apresentou massa corporal 84,6% menor que o grupo tratado por 90 dias, com dieta normoproteica (14%).

Neste estudo os animais receberam dieta hipoproteica após o desmame (após o 21^o dia de vida), sendo respeitado o período de lactação normal, o que provocou uma redução de 61,31 % da massa corporal nos animais não submetidos à lesão nervosa e de 64,5 % naqueles que sofreram lesão nervosa. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Bengelloun (1990), que estudou ratos desnutridos (8% de proteína) após o desmame e observou massa corporal 50% menor que o grupo normalmente nutrido (21% de proteína).

A redução de massa corporal observada nos animais deste estudo, os quais sofreram restrição proteica após o desmame, acompanha os resultados observados por outros autores (Medeiros et al., 2001; Fukuda, Françolin-Silva e Almeida, 2002; Silva e Almeida, 2006), mesmo quando a restrição proteica ocorre no início da vida pós natal (1^o dia de vida extrauterina), o que fortalece a hipótese de Neiva e Mello (1999) de que neste período da vida pós natal o suprimento ideal de aminoácidos que agem na formação de hormônios e enzimas que atuam no desenvolvimento ponderal e crescimento poderia ser comprometido pela desnutrição.

Neste estudo não foi possível comparar a massa corporal dos grupos CN e CD com os grupos LN e LD, pois os primeiros tiveram sua massa corporal computada após 45 dias de sobrevivência, enquanto os últimos tiveram valores de massa corporal aferidos após 66 dias de sobrevivência, devido à necessidade de acompanhar a recuperação da lesão.

5.4 Imunorreatividade de MAP2 e PAN x Desnutrição

A desnutrição causou diminuição significativa da imunorreatividade de MAP2 e PAN, nos córtices M1 e M2, quando observados os valores médios dos dois hemisférios cerebrais, havendo uma redução de 73% no córtex motor primário (M1) e 74% no córtex motor secundário (M2) para MAP e de 87% no córtex motor primário (M1) e 85% no córtex motor secundário (M2) para PAN.

Quando estes valores são analisados unilateralmente, nota-se que nos animais do grupo CD a redução da imunorreatividade de MAP2 e PAN ocorre em ambos os hemisférios em relação ao CN, de forma homogênea.

Segundo Morgane et al. (1978), a maturação pós natal do cérebro do rato requer de 21 a 23 dias. Blue e Parnavelas (1983), citados por McCormick e Prince (1987), apontam que existe uma subsequente proliferação da arborização dendrítica e axonal e de contatos sinápticos desde o nascimento até 21 dias de vida pós natal no rato, quando a fase adulta é atingida. Já Cordero et al. (2003), citam que neurônios imaturos de ratos completam seu desenvolvimento axonal e dendrítico aos 28 dias pós natal, sendo que desde o nascimento até este período o sistema nervoso está exposto a alterações na formação dendrítica e axonal advindas de fatores ambientais, nutricionais e hormonais. Cordero et al. (1986) identificaram que a desnutrição aplicada na fase pós natal gera alterações na arborização dendrítica das células piramidais (5ª camada) do neocórtex. Estas alterações podem ser agravadas na medida em que se amplia o tempo de desnutrição, não podendo ser revertidas pela recuperação nutricional (Cordero et al., 2003).

Comparando os efeitos da desnutrição pré e pós natal, Alamy e Bengelloun (2012) observaram que ambos períodos de desnutrição diminuem a migração celular, a neurogênese e a formação sináptica, mas apenas a desnutrição pós natal afeta as células piramidais, que

constituem a maior parte da extensão da 5^o camada do córtex motor (Molnár e Cheung, 2006), a qual foi analisada neste estudo.

A dieta hipoproteica aplicada a partir do 21^o dia pós natal neste estudo comprometeu apenas a fase final de maturação cerebral dos animais, entretanto, este comprometimento pode ter relação com o comprometimento do desenvolvimento cerebral, como identificado pela diminuição da imunorreatividade das proteínas estruturais do córtex cerebral (MAP2 e PAN).

A MAP2 é uma proteína estrutural que atua, juntamente com outros componentes intracelulares (actina, neurofilamentos e mitocôndria), para manter a neuroarquitetura, especialmente dos dendritos (Wiche, 1989). Atua também no crescimento, diferenciação e plasticidade de neurônios (Johnson e Jope, 1992). Portanto, a redução da imunorreatividade de MAP2 nos animais desnutridos neste estudo, no qual a desnutrição foi imposta no final do período de desenvolvimento neural (21^o ao 28^o dia pós natal), pode ser resultado de um atraso no desenvolvimento do SNC, com comprometimento da neuroarquitetura e, possivelmente, da função neuronal.

Os neurofilamentos, por sua vez, são responsáveis por manter a estrutura axonal, determinar o calibre dos axônios (Monaco et al., 1989; Perrot et al., 2008), pela diferenciação neuronal, crescimento e regeneração axonal (Perrot et al., 2008) e por participar do transporte axonal de metabólitos do corpo celular às sinapses (Hollenbeck, 1989). A formação dos neurofilamentos é influenciada pela concentração de sais e íons de metais em solução tampão, pelo grau de desnaturação e pela concentração de proteínas no organismo (Satoshi, 1990). Falhas na concentração de proteínas podem levar a alterações funcionais dos neurofilamentos, bem como diminuição do número de neurofilamentos nos axônios (Satoshi,

1990; Juranek, 2013), o que pode ter ocorrido neste estudo devido à fase da vida em que os ratos foram submetidos à desnutrição.

Em estudo em que ratos foram submetidos a uma dieta de 25% de proteína (caseína) e outro grupo a uma dieta com 8% de proteína, desde o nascimento até o desmame (21 dias), para verificar se a desnutrição precoce afeta a expressão de subunidades de neurofilamentos e a incorporação de fosfato *in vitro* aos neurofilamentos no cerebelo, foi observado que a concentração de proteínas totais não foi alterada com a desnutrição. Contudo, a concentração de subunidades de NFs de 200 e 150 KDa aumentou nos ratos jovens (22 dias), mas esse efeito estava ausente em ratos adultos (112 dias). Os autores concluíram que a desnutrição precoce parece interferir com mecanismos que regulam a formação de neurofilamentos durante o período de máximo desenvolvimento do cerebelo (Mattos et al., 1993).

Neste estudo, no grupo CD os ratos contavam com 66 dias, comparável a 1 ano e seis meses de idade humana (Quinn, 2005), sendo, portanto, considerados jovens e o foco da análise foi o córtex cerebral. Entretanto, é possível que a redução da imunorreatividade dos NFs esteja relacionada a um déficit de formação destes devido à desnutrição.

Outro estudo observou, em condição de desnutrição proteica, aumento da expressão de proteínas associadas aos neurofilamentos no córtex cerebral de ratos adultos que foram submetidos à desnutrição proteica (8% de caseína) durante o período de lactação (do nascimento até 21 dias), porém, quando observado imediatamente após a dieta hipoproteica, não havia alteração na expressão destas proteínas (Paz et al., 1991).

Considerando que a desnutrição proteica posnatal produz alterações neurofisiológicas (Lukoyanov e Andrade, 2000; Fukuda, Françolin-Silva e Almeida, 2002), morfológicas (Díaz-Cintra et al., 1991; Debassio et al., 1996) e neuroquímicas (Alamy et al., 2005) no encéfalo e

parece afetar seu desenvolvimento, interferindo com o surgimento de novas células, migração e diferenciação celular, mielinização e formação de sinapses (Debassio et al., 1994; Lukoyanov e Andrade, 2000), a redução da imunorreatividade de MAP2 neste estudo sinaliza que, diante da desnutrição, o desenvolvimento dendrítico teria sido comprometido, o que implica em conexões neurais reduzidas, tornando o sistema nervoso susceptível à disfunção, neste caso, de planejamento e execução do movimento.

Neste estudo, a dieta hipoproteica contou com uma redução de 52,86% de caseína em relação à dieta normoproteica, o que poderia ter promovido, em conjunto com as demais alterações já citadas, déficit no *input* elétrico, favorecendo comprometimento da funcionalidade motora. Portanto, considerando que microtúbulos e neurofilamentos tem importante papel no suporte do *input* elétrico do SNC (Hollenbeck, 1989), a redução da imunorreatividade de MAP2 e de PAN sugere alterações no *input* elétrico nos animais desnutridos. Entretanto, testes motores específicos, como o Índice Funcional do Ciático (IFC), devem ser realizados para comprovar estas hipóteses.

5.5 Imunorreatividade de MAP2 e PAN x Lesão nervosa periférica x desnutrição

Analisando-se os valores médios da densidade integrada de MAP2 e PAN nos córtices M1 e M2, nota-se significativa diminuição da imunorreatividade destas proteínas na condição de lesão nervosa. Entretanto, cabe destacar a aqui que o controle do LD foi o LN, mas não o CD, em virtude dos tempos de coleta dos encéfalos nos diferentes grupos, conforme o cronograma de desnutrição estabelecido para este estudo. Portanto, uma análise dos valores médios, sem levar em consideração os hemisférios cerebrais, individualmente, mostra um resultado muito semelhante ao encontrado no grupo CD.

Por outro lado, quando se realiza uma análise unilateral, evidencia-se que após 21 dias da axoniotmese o córtex motor do hemisfério contralateral à lesão (experimental) apresenta imunorreatividade de MAP2 e de PAN significativamente reduzida em relação ao córtex motor do hemisfério homolateral à lesão (controle), tanto em M1 quanto em M2, ainda que em condição nutricional normal.

Uma agressão à estrutura de um nervo periférico pressupõe reorganização estrutural da área do córtex motor, responsável pela região afetada (Chen, Cohen e Hallett, 2002; Lundborg, 2003). Analisando o córtex motor de indivíduos com amputação de membro superior, Karl et al. (2001), observaram que a área motora responsável por estruturas específicas do membro ausente havia modificado sua localização no encéfalo. No caso da área do córtex motor responsável pelo bíceps braquial do membro amputado, por exemplo, estava posicionada medialmente quando comparado à mesma área no hemisfério contralateral, responsável pelo membro intacto.

Essa condição de alteração da estrutura cortical se evidencia também nos ratos. Após a secção de um nervo periférico, a região do córtex motor responsável por aquele nervo estabelece conexões com regiões não lesadas, buscando se estabilizar e diminuir os agravos advindos da lesão. Esta reorganização pode ser analisada meses após a lesão (Donoghue; Suner; Sanes, 1990; Sanes; Suner; Donoghue, 1990).

Após lesão no nervo isquiático observam-se alterações na citoarquitetura das camadas do córtex motor (Lasko et al., 2013). Especificamente em relação a 5ª camada cortical, uma lesão nervosa periférica pode causar alterações irreversíveis de neurônios, pois as perdas de alvos sinápticos de neurônios piramidais e neurônios pré-motores do córtex que enviariam informações para os motoneurônios inferiores, desencadeiam alterações permanentes no

córtex motor contralateral à lesão (Munera; Cuesta; Troncoso, 2012). As alterações permanentes estão ligadas, principalmente, à retração da arborização dendrítica em longo prazo (Troncoso e Múnera, 2008; Urrego, Múnera e Troncoso, 2011).

Quando a desnutrição foi associada à lesão nervosa, a densidade integrada de MAP2 e PAN já se encontra fortemente reduzida em relação ao respectivo controle (LN) no hemisfério homolateral à lesão, provavelmente devido às alterações causadas pela desnutrição e, no hemisfério contralateral à lesão esta redução é ainda maior que no grupo LN, ou seja, a desnutrição associada à axoniotmese agravou a redução da densidade integrada de MAP 2 e PAN em M1 e M2 (exceto no caso de PAN – M1). Estes resultados sugerem que a recuperação funcional após lesão nervosa periférica em condição de desnutrição estaria ainda mais prejudicada, pois os neurofilamentos atuam na regulação do calibre axonal e, conseqüentemente, na velocidade de condução nervosa, na diferenciação neuronal, crescimento e regeneração axonal (Perrot et al., 2008).

A proteína MAP2 está presente nos dendritos e desempenha um importante papel na definição e estabilização da arquitetura da arborização dendrítica, além de ser um sensível marcador de alterações na estrutura dos dendritos (Tucker, Garner e Matus, 1989; Book et al., 1996; Björkblom et al., 2005). Assim, os dados deste estudo sugerem que houve uma retração dendrítica, como também foi observado por outros autores (Tucker, Garner e Matus, 1989; Book et al., 1996).

No SNP está bem estabelecido que após uma lesão por compressão ou secção, a porção distal dos axônios se desintegra no processo de degeneração Walleriana. Nessa região, os neurofilamentos e microtúbulos do axoplasma também se desintegram devido a um

processo proteolítico dependente de cálcio e mediado por enzimas ativadas pelo cálcio no axoplasma (Schlaepfer e Hasler, 1979).

Dentre os diferentes estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa Plasticidade Neuromuscular da Unimep, as características morfológicas do nervo isquiático tem sido estudadas na condição de desnervação, incluindo a aplicação de recursos fisioterapêuticos relacionados à estimulação da regeneração nervosa (Oliveira et al., 2008; Takeda et al., 2008; Sobral et al., 2008, Lima et al., 2009), Teodori et al., 2011^a; Teodori et al., 2011b). Entretanto, nenhum destes estudos avaliou a densidade dos neurofilamentos no SNP ou no SNC. Sabe-se que os neurofilamentos tem papel fundamental na estabilização do calibre dos axônios e a redução de seu calibre está relacionada, entre outras coisas, à diminuição na quantidade de neurofilamentos (Hoffman et al., 1985).

Lesões nervosas periféricas induzem uma cascata de eventos concorrentes em nível sistêmico, celular e molecular, que tem início com a lesão e progridem para a medula espinal, núcleos relacionados no tronco encefálico, tálamo e córtex cerebral (Navarro; Vivó; Valero-Cabrè, 2007). Devido à profunda integração funcional entre SNC e SNP, uma lesão nervosa periférica sempre resulta em profundas e duradouras modificações corticais (Kaas, 1991; Wall, Xu e Wang, 2002; Kaas e Collins, 2003).

Considerando que não foram identificados estudos que tenham avaliado a imunorreatividade de proteínas associadas aos neurofilamentos no córtex cerebral após lesão nervosa periférica e que a desnutrição, assim como a lesão nervosa podem desorganizar a citoarquitetura do córtex motor (Wall; Xu; Wang, 2002; Kaas; Collins, 2003, Lundborg, 2003), a diminuição da imunorreatividade de proteínas associadas aos NFs sugere um comprometimento da função destas estruturas na condição experimental estudada, refletindo

na redução da velocidade de condução do impulso nervoso e consequente comprometimento da funcionalidade.

Estes resultados fornecem subsídios para a investigação da ação de diferentes recursos fisioterapêuticos que estimulem a plasticidade do córtex motor após lesão nervosa periférica.

6. CONCLUSÃO

Tanto a desnutrição quanto a lesão nervosa, isoladamente, promoveram redução da imunorreatividade de MAP2 e de PAN nas áreas motoras primária e secundária do córtex contralateral à lesão, condição que foi agravada pela associação entre lesão nervosa e desnutrição, sugerindo que a recuperação funcional em animais desnervados e desnutridos estaria mais comprometida que em animais desnervados normalmente nutridos.

Estes resultados são relevantes para a definição de estratégias específicas para reabilitação da lesão nervosa na condição de desnutrição.

Estudos futuros devem se voltar à investigação dos efeitos dos métodos de intervenção fisioterapêutica utilizados para recuperação da lesão nervosa periférica sobre a reorganização do córtex motor, o que poderia potencializar tal recuperação.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das importantes limitações deste estudo foi a ausência de um grupo CN e CD com sobrevida de 66 dias, para possibilitar uma análise comparativa entre todos os grupos estudados. Por este motivo apenas foi possível a comparação entre os grupos controle e entre os grupos submetidos à lesão nervosa, mas não dos grupos lesados com os controles.

Também limitou o estudo o fato de não ter sido coletado o nervo isquiático para análise morfométrica, o que poderia sinalizar a relação entre neurofilamentos nas áreas motoras corticais e da medula espinal e calibre axonal. Esta análise não foi realizada em função da necessidade de perfusão dos animais com paraformaldeído para coleta do encéfalo e medula, sendo que para análise morfométrica do nervo realiza-se fixação *in situ* com fixador de Karnovsky e posterior imersão no mesmo fixador. Para as etapas subsequentes do processamento do nervo, a fixação com paraformaldeído poderia comprometer a qualidade do material a ser analisado.

Outra limitação foi o fato de não ter sido marcado o hemisfério experimental e o lesado, o que precisa ser observado em estudos futuros.

Neste estudo não foi realizada a avaliação da funcionalidade para a marcha nos animais submetidos à lesão nervosa, o que poderia agregar informações sobre a recuperação da função após a lesão e lesão associada à desnutrição.

8. ETAPAS FUTURAS

Em continuidade a este estudo, está em andamento a uma análise imunohistoquímica da densidade integrada de MAP2 e PAN no corno anterior da medula espinal lombar (L4 e L5) de ratos submetidos à desnutrição proteica e axoniotmese, para quantificação das alterações citoarquiteturais das células motoras na medula espinal e comparação na condição de lesão nervosa e nutrição normal com lesão nervosa e desnutrição.

REFERÊNCIAS*

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.

Alamy M, Bengelloun WA. Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neurosci Biobehav Reviews*. 2012; 36(6): 1463-1480.

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.

Araújo E J A, Sant'Ana D M G, Molinari S L, Neto M H M. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morpho-quantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adult rats. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2003; 61 (2): 226 – 33.

Bach-y-Rita P. Brain plasticity as a basis for recovery of function in humans. *Neuropsychologia* 1990; 28: 547–554.

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

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

Björkblom B, Ostman N, Hongisto V, Komarovski V, Filén JJ, Nyman TA, Kallunki T, Courtney MJ, Coffey ET. Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci*. 2005; 25(27): 6350-61.

Black R E, Allen L H, Bhutta Z A, Caufield L A, De Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*. 2008; 371(9608): 243-60.

Blue M E, Parnavelas J G. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J Neurosci*. 1983; 12: 599-616.

Book A. A.; Fischer i.; Yu X. J.; Iannuzzelli p.; Murphy E. H. Altered expression of microtubule-associated proteins in cat trochlear motoneurons after peripheral and central lesions of the trochlear nerve. *Exp Neurol*. 1996. 138 (2): 214–26.

Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Dimensão Social – Saúde. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2010. Disponível em: <

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf >. Acesso em: 19 abril 2013.

Brasil. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Dimensão Social – Saúde. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2012. Disponível em: <
ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf >. Acesso em: 19 abril 2013.

Brasil-Neto JP, Cohen LG, Pascual-Leone A, Jabir FK, Wall RT, Hallett M. Rapid reversible modulation of human motor outputs after transient deafferentation of the forearm: a study with transcranial magnetic stimulation. *Neurology*. 1992; 42:1302-6.

Brasil-Neto JP, Valls-Sole J, Pascual-Leone A, Cammarota A, Amassian VE, Cracco R, et al. Rapid modulation of human cortical motor outputs following ischaemic nerve block. *Brain*, 1993; 116: 511-25.

Bunge M B. The axonal cytoskeleton: its role in generating and maintaining cell form. *Trends Neurosci*. 1986; 9: 477–82.

Burnett M G, Zager E L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16 (5): 1 - 7.

Bütefisch CM, Davis BC, Wise SP, Sawaki L, Kopylev L, Classen J. et al. Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. 97: 3661-5.

Burt CM. Avaliação do trabalho e preparação para o retorno ao trabalho. In: Pedretti LW, Early MB. *Terapia ocupacional: capacidades práticas para disfunções físicas*. Ed. Roca. 2005; 241-254.

Chaudhary R, Chugh M, Darokhan Z, Katreddi R R, Ramachandra R, Rema V. Physiological Slowing and Upregulation of Inhibition in Cortex Are Correlated with Behavioral Deficits in Protein Malnourished Rats. *PLoS One*. 2013; 8 (10): 1-14.

Chen R, Cohen L G, Hallett M. Nervous system reorganization following injury. *Neurosci*, 2002; 111(4): 761-773.

Chung G H, Han Y M, Jeong, S H, Jack C R. Functional Heterogeneity of the Supplementary Motor Area. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26:1819–23.

Classen J, Liepert J, Wise SP, Hallett M, Cohen LG. Rapid plasticity Of human cortical movement representation induced by practice. *J Neurophysiol*, 1998. 79:1117-23.

Cordero ME, Trejo M, Garcia E, Barros T, Rojas A M, Colombo M. Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained prenatal and/or postnatal life malnutrition, *Early Hum Dev*. 1986; 14: 245–248.

Cordero M E, D'Acufia E, Benveniste S, Prado R, NufiezJ A, Colombo M. Dendritic Development in Neocortex of Infants with Early Postnatal Life Undernutrition. 1993; 9 (6): 457-464.

Cordero M E, Venezuela C Y, Rodriguez A., Aboitiz F. Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of the neocortex in two groups of early postnatal undernourished– rehabilitated rats. *Develop Brain Res.* 2003; 142: 37–45.

Da Silva SV¹, Salama C, Renovato-Martins M, Helal-Neto E, Citelli M, Savino W, Barja-Fidalgo C. Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation. *PLoS One.* 2013 May 10;8(5):e64220

Debassio W A, Kemper T L, Galler J R, Tonkiss J. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull.* 1994; 35 (1): 57–61.

Debassio W A, Kemper T L, Tonkiss J, Galler J R. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull.* 1996; 41 (6): 379–383.

Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2004; 6 (1): 1 - 10.

Delaney A J, Smorajski T, Fuller G N, Wiggins R C. A morphometric comparison of central and peripheral hypomyelination induced by undernourishment of rats. *J Nutr.* 1981; 111: 746 – 54.

De Belchior A C, Angeli J K, Faria T O, Siman F D, Silveira E A, Meira E F, da Costa C P, Vassallo D V, Padilha A S. Post-weaning protein malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. *PLoS One.* 2012; 7(4): 34876.

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.

Donoghue JP, Suner S, Sanes JN. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp Brain Res,* 1990. 79: 492-503.

Erturk A, Hellal F, Enes J, Bradke F. Disorganized Microtubules Underlie the Formation of Retraction Bulbs and the Failure of Axonal Regeneration. *J Neurosci.* 2007; 27(34): 9169 – 180.

Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec.* 2001; 263(4): 396-404.

Fernandes K C B G, Polacow M L O, Guirro R R J, Campos G E R, Somazz M C, Pinto V F, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot.* 2005; 9 (2): 235-41.

Funkhouser E. B. The visual cortex, its localization, histological structure, and physiological function. *J Exp Med.* 1915; 21 (6): 617-628.

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.

Garcia P C, Real C C, Ferreira A F, Alouche S R, Britto L R, Pires R S. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res.* 2012; 1456: 36-48.

Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature. *Muscle Nerve.* 2005; 31(6): 694-701.

Gigo-Benato D, Russo T, Tanaka E, Assis L, Salvini T, Parizzoto N. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(9): 673-682.

Goedert M, Crowther R A, Garner C C. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in Neurosci.* 1991; 14 (5): 193 – 99.

Graziano M. The organization of behavioral repertoire in motor cortex. *Annu Rev Neurosci.* 2006; 29: 105-34.

Hedley-Whyte E T. Myelination of rat sciatic nerve: comparison of undernutrition and cholesterol biosynthesis inhibition. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1973; 32: 284-302.

Hoffman P N, Thompson G W, Griffin J W, Price D L. Changes in neurofilament transport coincide temporally with alterations in the caliber of axons in regenerating motor fibers. *J Cell Biol.* 1985; 101(4): 1332-40.

Hollenbeck P.J. The Transport and Assembly of the Axonal Cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1989; 108(2): 223–227.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials.* 2004; 25(9): 1583-1592.

Johnson G V W, Jope R S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration, *J Neurosci Res.* 1992; 33(4): 505-512.

Juranek JK. Axonal transport of cytoskeleton and cytoskeleton regulatory cargo proteins in neurodegenerative disorders. *O A Anatomy*. 2013; 1(3):22.

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

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

Karl A, Birbaumer N, Lutzenberger W, Cohen LG, Flor H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J Neurosci*. 2001; 15:21 (10).

Kitamura J H. Recuperação morfológica e funcional do nervo isquiático de ratos após desnutrição/renutrição dietética e axoniotmese [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP, 2013.

Kouyoumdjian A J. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve*. 2006; 34(6): 785-88.

Lasko L, Huang X, Voorbach M J, Lewis LG, Stavropoulos J, Carriker J, Seifert T R, Baker S J, Upadhyay J. Multimodal assessment of nervous and immune system responses following sciatic nerve injury. *Pain*. 2013; 154(12): 2782-93.

Laus M F, Vales L D M F, Costa T M B, Almeida S S. Early Postnatal Protein-Calorie Malnutrition and Cognition: A Review of Human and Animal Studies. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8: 590-612.

Lima S C, Caierão Q M, Peviani S M, Russo T L, Somazz M C, Salvini T F, Teodori R M, Minamoto VB. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle. *Am J Phys Med Rehabil* 2009; 88:126–135.

Lopes EI. Aspectos sociais e econômicos dos traumatismos da Mão In: Pardini AG. *Traumatismos da mão*. 3ª ed. São Paulo: Medsi, 2000.

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.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg*. 2000; 25(3): 391-414.

Lundborg G. Nerve injury and repair – a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*. 2003; 8(4): 209-26.

Lundborg G. *Nerve injury and repair*, 2nd edition. Edinburg: churchill Livingstone; 2005.

Machado ABM. Neuroanatomia funcional. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 363p.

Mao T, Kusefoglud, Hooks B M, Huber D, Petreanu L, Svoboda K. Long-Range Neuronal Circuits Underlying the Interaction between Sensory and Motor Cortex. *Neuron*. 2011; 72(1):111-23.

Mattos AG, Camargo MM, Freitas M, Pessoa-Pureur R. Malnutrition increases neurofilament subunits concentration in rat cerebellum. *J Nutr Biochem*. 1993; 4(11): 644-50.

McAllister RM, Gilbert SE, Calder JS, Smith PJ. The epidemiology and management of upper limb peripheral nerve injuries in modern practice. *J Hand Surg Br*. 1996; 21(1): 4-13.

McCormick D A, Prince D A. Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J. Physiol*. 1987; 393: 743-762

Medeiros J M B, Da Silva C M, Sougey E B, Costa J A, De Castro C M M B, De Castro R M. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. *Arq. Neuro Psiquiatr*. 2001; 59 (3): 499-503.

Merino-Sanjuán M, Catalán-Latorre A, Nácher A, Miralles-Arnau S, Jiménez-Torres NV. Animal model of undernutrition for the evaluation of drug pharmacokinetics. *Nutr Hosp*. 2011; 26(6):1296-304.

Merzenich M M, Kaas J H, Sur M, Lin C S. Double representation of the body surface within cytoarchitectonic areas 3b and 1 in "SI" in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *J Comp Neurol* 1978; 181:41–73;

Merzenich M M, Kaas J H, Wall J, Nelson R J, Sur M, Felleman D. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neurosci.* 1983; 8:33–55;

Merzenich M M, Nelson R J, Stryker M P, Cynader M S, Schoppmann A, Zook J M. Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 1984; 224: 591– 605;

Merzenich MM, Nelson RJ, Kaas JH, Stryker MP, Jenkins WM, Zook JM, Cynader MS, Schoppmann A. Variability in hand surface representations in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *J Comp Neurol* 1987;258:281–296

Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin.* 2000; 16(1): 73-91.

Molnár Z, Cheung A F. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res.* 2006; 55: 105–115.

Monaco S, Autilio-Gambetti L, Lasek RJ, Katz M, Gambetti P. Experimental increase of neurofilament transport rate: decreases in neurofilament number and in axon diameter. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1989; 48: 23-32.

Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002; 420(6915): 520-62.

Morgane P J, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hal R, et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 1978; 2: 137-230.

Morgane P J, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Galler J R. Malnutrition and development central nervous system. *The vulnerable Brains Environmental risks, malnutrition and hazard assessment*, edited by Robert I, Isaacson and Karl F. Jensen. Plenum Press, New York, 1992.

Morgane P J, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, et al. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17(1): 91-128.

Morgane P J, Mokler D J, Galler J R. Prenatal malnutrition and development of protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; 26 (4): 471-83.

Munera A, Cuesta D M, Troncoso J. Peripheral facial nerve lesions induce changes in the firing properties of primary motor cortex layer 5 pyramidal cells. *Neurosci.* 2012; 223: 140–151.

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

Neiva C M, Melo M A R. 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. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J Pediatr.* 2002; 78 (1): 39-44.

Ohishi T, Wang L, Akane H, Shiraki A, Sato A, Uematsu M, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M. Adolescent hyperactivity of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation periods in rats. *J Toxicol Sci.* 2012; 37(2): 345-52.

Oishi Y, Zhengwei F, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Effects of protein deprivation on $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen and its degrading system in rat skin. *Biosci Biotechnol and Biochem.* 2002; 66: 117-26.

Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SYM, Betini J, Guirro RRJ, Somazz MC, et al. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. *Rev Neurol.* 2008; 47(1): 11-5.

Pascual-Leone A, Nguyet D, Cohen LG, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Hallett M. Modulation of muscles responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol.* 1995; 74:1037-45.

Pascual-Leone A, Grafman J, Hallett M. Modulation of cortical motor outputs maps during development of implicit and explicit Knowledge. *Science.* 1994; 263: 1287-99.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Elsevier Academic Press, 2005.

Paz M M, Valente G B, Tasca C L, De Matos A G, Pureur R P. Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. *J Nutr.* 1991; 121(9): 1349-54.

Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2008; 38(1): 27–65.

Pezolato V A, Mascarin A L, Paulino P C, Silva C A. Padrão eletrocardiográfico de ratos após recuperação nutricional. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2013; 46(3): 281-8.

Petersen T H, Willerslev-Olsen M, Conway B A, Nielsen J B. The motor cortex drives the muscles during walking in human subjects. *J Physiol*. 2012; 2443–2452.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21(6): 775-7.

Redemacher J, Glaburda A M, Kennedy D N, Filipek P A, Caviness Jr V S. Human cerebral cortex: localization, parcellation, and morphometry with magnetic resonance imaging. *J Cogn Neurosci*. 1992; 4 (4): 352-374.

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

Rice D, Barone, Jr S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(3): 511–533.

Rinaldi J C, Justulin L A Jr, Lacorte L M, Sarobo C, Boer P A, Scarano W R, Felisbino S L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Sci*. 2013; 92(13): 763-74.

Sanes J N, Suner S, Donoghue J P. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats I. Long-term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions. *Exp Brain Res.* 1990; 79: 479-49.

Sanes JN, Suner S, Lando JF, Donoghue JP. Rapid reorganization of adult rat motor cortex somatic representation patterns after motor nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 2003-7.

Satoshi T. On the assembly mechanism of neurofilaments. *Inr. J. Biochem.* 1990; 22 (1): 1 – 6.

Schlaepfer W W, Hasler M B. Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve. *Brain Res.* 1979; 168: 299-309.

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): E1.

Segura J C, Guadarrama A L, Gutierrez H, Merchant L, Cintra I J. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci.* 2001; 4: 475-88.

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013; 4(6): 624-30.

Siedler D G, Chuah M I, Kirkcaldie M T, Vickers J C, King A E. Diffuse axonal injury in brain trauma: insights from alterations in neurofilaments. *Front Cell Neurosci.* 2014; 17 (8): 429 -434.

Silva V C, Almeida S S. Desnutrição protéica no início da vida prejudica memória social em ratos adultos *Rev Nutr.* 2006; 19(2): 195-201.

Sobral L L, Oliveira L S, Takeda S Y M, Somazz, M C, Montebelo I L, Teodori R M. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise histomorfométrica e funcional. *Rev Bras Fisiot.* 2008; 12: 311-316.

Takeda S Y M, Oliveira L S, Sobral L L, Somazz M C, Montebelo M I L, Teodori R M. Regeneración Nerviosa Periférica en ratones expuestos a un ambiente enriquecido. *Rev Neurol.* 2008; 47: 185-190.

Teodori RM, Silva AM, Silva MT, Oliveira LS, Polacow MLO, Guirro EC. High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. *Rev Bras Fisioter.* 2011a; 15(4): 325-31.

Teodori RM, Betini J, de Oliveira LS, Sobral LL, Takeda SY, de Lima Montebelo MI. Swimming Exercise in the Acute or Late Phase after Sciatic Nerve Crush Accelerates Nerve Regeneration. *Neural Plast.* 2011b; 12(4): 311-318.

The State of Food Insecurity in the World 2013: The multiple dimensions of food security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

Troncoso J, Múnera A. Cambios inducidos en la corteza motora primaria de la cara por lesión periférica del nervio facial contralateral. *Acta Biol Colombiana*. 2008; 13: 220.

Tucker R P, Garner C C, Matus A. In Situ localization of Microtubule-Associated Protein mRNA in the Developing and Adult Rat Brain. *Neuron Cell Press*. 1989; 2: 1245-1256.

Urrego D, Múnera A, Troncoso J. Peripheral facial nerve lesion induced long-term dendritic retraction in pyramidal cortico-facial neurons. *Biomedica*. 2011; 31(4): 560-9.

Vasconcelos C A C, Fazan V P S, Valença M M. Neuropatia Diabética, Desnutrição e Sistema Nervoso. *Neurobiol*. 2009; 72 (3): 129 –36.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst*. 2000; 5(4):191-208.

Wall J T, 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.

Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*. 2010; 26: 862-6.

Williams P L, Warwick R, Dyson M, Bannister L H. *Gray Anatomia*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1995.

Wiche G. High-M (r) microtubule-associated proteins: properties and functions. *J Biochem*; 1989; 259(1): 1-12.

Ziemann U, Hallett M, Cohen L G. Mechanisms of deafferentation-induced plasticity in human motor cortex. *J Neurosci*. 1998; 18: 7000-7.