

ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA

**DESNUTRIÇÃO PRÉ-NATAL: REPERCUSSÕES SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LOCOMOTOR EM
RATOS**

Recife

2008



Thèse présentée

par

Ana Elisa TOSCANO Meneses da Silva

**DÉNUTRITION PRÉ-NATALE: REPERCUSSION SUR LE
DEVELOPPEMENT DU SYSTEME LOCOMOTEUR CHEZ LE
RAT**

Pour l'obtention du grade de Docteur
de l'Université de Technologie de
Compiègne (UTC) et de l'Université
Fédéral de Pernambuco (UFPE)

Thèse en co-tutelle dirigée par:

Francis CANON, UMR 6600, UTC - France

Raul MANHAES DE CASTRO, Departamento de Nutrição, UFPE – Brésil

Recife

2008



Tese apresentada

por

Ana Elisa TOSCANO Meneses da Silva

**DESNUTRIÇÃO PRÉ-NATAL: REPERCUSSÕES SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LOCOMOTOR EM
RATOS**

Para obtenção do título de Doutor do
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco e da Escola de Doutorado
da Universidade de Tecnologia de
Compiègne

Tese co-tutela orientada por :

Raul MANHAES DE CASTRO, Departamento de Nutrição, UFPE – Brasil
Francis CANON, UMR 6600, UTC - França

Recife

2008

Silva, Ana Elisa Toscano Meneses da
Desnutrição pré- natal: repercussões sobre o desenvolvimento do sistema locomotor em ratos / Ana Elisa Toscano Meneses da Silva. – Recife : O Autor, 2008.

230 folhas : Il.; fig. e tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2008.

Inclui bibliografia, anexos.

1. Desnutrição. 2. Músculo esquelético. 3.

Sistema locomotor. 4. Programming I.Título.

612.7
612.74

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2008-138

DESNUTRIÇÃO PRÉ-NATAL: REPERCUSSÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LOCOMOTOR EM RATOS

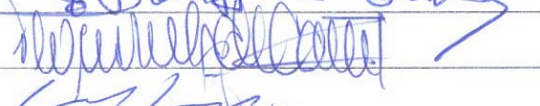
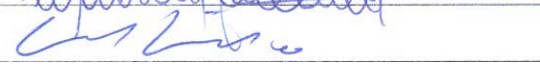
ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA

Tese aprovada em 02 de outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA:

- 1º Examinador: FRANCIS CANON
- 2º Examinador: EGBERTO GASPAR DE MOURA
- 3º Examinador: TEREZA CRISTINA BONFIM DE JESUS DEIRÓ
- 4º Examinador: FLORISBELA DE ARRUDA CAMARA E SIQUEIRA CAMPOS
- 5º Examinador: CAROL VIRGÍNIA GÓIS LEANDRO

ASSINATURAS :

1º) Examinador: _____
2º) Examinador:  _____
3º) Examinador:  _____
4º) Examinador:  _____
5º) Examinador:  _____

**Recife
2008**

Aos meus queridos pais João Pereira da Silva Sobrinho e

Maria Valdete Toscano Meneses da Silva

e

Ao meus queridos filhos gêmeos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Deus, por me conceder a graça de concluir esta tese!

A meus orientadores:

*Professor **Raul**, alguém que sabe bem enxergar o que há de melhor nas pessoas, em cada uma delas por mais diferentes que sejam.*

*« Não lhe posso dar
O que já existe em você mesmo.
Não posso atribuir-lhe
Outro mundo de imagens
Além daquele que há em sua própria alma.
Nada lhe posso dar a não ser
A oportunidade, o impulso,
A chave.
Eu ajudarei a tornar visível
O seu próprio mundo.
É tudo. »
Herman Hesse.*

Mr Francis Canon, ma profonde gratitude! Merci pour votre dédication, patience et compréhension ! Vos suggestions et critiques judicieuses ont largement contribué à la finalisation de ce travail.

AGRADECIMENTOS AOS BRASILEIROS

Aos meus irmãos Carlos Henrique, Juliana e Diógenes, meu cunhado Euclides e minha cunhada Thaís, pela compreensão e apoio.

Ao meu companheiro e amigo Raul pelo amor, carinho e apoio durante a finalização desta tese.

A Marco Fidalgo, Edvaldo Vasconcelos, Antônio Santos, José Cândido, Raquel Aragão e Carlos Henrique vocês foram muito importantes para a realização dos experimentos desta tese.

Aos amigos do grupo Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade presentes nos momentos importantes.

Às estagiárias Cândida, Gilca e Juliana pela importante contribuição que deram a este trabalho.

À Lúcia Pires pela sugestões e auxílio estatístico.

Ao Professor Eulálio Cabral pelas orientações estatísticas.

Ao veterinário Dr. França, pelo apoio no manuseio dos animais deste trabalho.

A Vânia Moura do Instituto Butantã pelos ensinamentos sobre bioterismo.

Aos funcionários Hamilton Salviano (in memoriam) e Paulino Ventura, pela colaboração na elaboração das dietas e manuseio dos animais.

À secretária da Pós-graduação Neci, pela dedicação e colaboração aos alunos da Pós-Graduação em Nutrição.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e ao CAPESCOFECUB do ministério da Educação e Cultura, pela concessão da bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS A EQUIPE DO LABORATÓRIO FRANCÊS

Mr Goubel, je vous présente ma sincère gratitude et toute ma reconnaissance. Un honneur de vous avoir connu. Merci pour votre conseil et votre disponibilité à nous aider.

Madame Marque, Je tiens à vous remercier pour m'avoir fait l'honneur de faire parti du jury.

Sandy, merci pour la compagnie dans les moments difficiles et aussi pour les bons moments en France. Merci pour me faire connaissance avec tous les autres agréables libanais: Maha, Roger, Joseph, Bouchra, Fadi... et en spécial à Diima pour sa gentillesse et l'attention.

Au copain de labo Julien Gueib et Hua Cao. Merci aussi à Daniel et Nassim.

Aux brésiliennes en France: Claudia Mourthe et Mônica Hallack.

A Marie –Jo Fleury pour les enseignements et de l'aide au cours dans ce travail et à Catherine Lacourt pour les lignes directrices et d'assistance aux étudiants étrangers. A les deux Marie-Jo et Catherine merci pour votre gentillesse.

A Clotilde Vanhoutte merci pour sa grande disponibilité.

RESUMO

Nesta tese avaliamos as repercussões da desnutrição intra-uterina sobre o desenvolvimento do sistema locomotor em ratos. Foram utilizados ratos Wistar neonatos provenientes de mães que receberam dieta controle (Grupo Controle – C, 17% de proteína) ou uma dieta hipoprotéica e isocalórica (Grupo Desnutrido – D, 7,8% de proteína). Após o nascimento os animais receberam a dieta normoprotéica até as respectivas idades experimentais. Os componentes contráteis e elásticos em série e em paralelo foram estudados no soleus e extensor digitorum longus (EDL) aos 25 e 90 dias de vida. A análise histológica das fibras musculares foi também realizada. Do 1º ao 21º dia de vida, os animais foram avaliados quanto ao seu crescimento somático, maturação de características físicas e de reflexos. No 8º, 14º, 17º, 21º e 90º, a atividade locomotora e a trajetória desempenhada pelos animais foram analisadas. O Grupo D apresentou atrofia muscular e diminuição da força muscular no músculo aos 25 e 90 dias. Houve aumento na velocidade máxima de encurtamento no soleus e EDL aos 25 e 90 no grupo D. A rigidez do componente elástico em série nos desnutridos foi aumentada no soleus, enquanto que no EDL foi observada uma diminuição dessa rigidez aos 25 dias de vida. Houve aumento da rigidez dos elementos elásticos em paralelo em ambos nos músculos de desnutridos aos 25 dias. A análise das proporções dos tipos de fibras no grupo D aos 25 e 90 dias revela aumento nas fibras tipo IIa no soleus e aumento das fibras IIb e diminuição das fibras IIa no EDL. Houve redução do crescimento somático e retardo na maturação das características físicas e dos reflexos nos desnutridos. Na avaliação da atividade locomotora houve aumento da distância percorrida, da velocidade e da potência média no 14º e 17º dia de vida nos desnutridos. O tempo que o animal desnutrido permaneceu parado diminuiu do 14º ao 21º dia, aumentando o número de paradas e diminuindo a duração média em cada parada no 14º e 17º dia de vida. Na análise da trajetória desses animais observa-se que aos 14º e 17º dias os permanecem mais tempo nas áreas mais periféricas do campo e esse comportamento se inverte aos 90 dias de idade no grupo D. A persistência de certas alterações estruturais e funcionais revela que a adaptação intra-uterina do sistema músculo-esquelético, para enfrentar a desnutrição, tem consequências permanentes o que pode comprometer a locomoção do animal.

Palavras-chave: Desnutrição, “Programming”, músculo esquelético, sistema locomotor

RESUMÉ

Dans cette thèse nous avons évalué les effets de la dénutrition intra-utérine sur le développement du système locomoteur chez le rat. Nous avons utilisé des rats nouveau-nés dont les mères ont reçu une alimentation contrôle (groupe de Contrôle - C, 17% de protéines) ou une alimentation hypoproteique et isocalorique (groupe Dénourri - D, 7,8% de protéines) pendant la gestation. Après la naissance les animaux ont reçu l'alimentation normoproteique. Les composantes contractile, élastique série et élastique parallèle ont été étudiées dans les soleus et l'Extensor Digitorum Longus (EDL) à 25 et 90 jours de vie en conditions isolées. L'analyse histologique des muscles a également eu lieu. Du 1^{er} au 21^{ème} jour de vie, la croissance somatique, la maturation des caractéristiques physiques et des réflexes ont été évalués. A 8, 14, 17, 21 et 90 jours, l'activité locomotrice et la trajectoire des animaux ont été examinées par analyse vidéo du déplacement de l'animal dans un champ circulaire. Le groupe D a montré une atrophie musculaire, une diminution de la force ainsi qu'une augmentation de la vitesse maximale de raccourcissement des muscles soleus et EDL à 25 et 90 jours de vie. La raideur de l'élément élastique en série est augmentée dans le soleus, tandis que l'EDL a subi une diminution de raideur à 25 jours de vie dans le groupe D. Il y a eu une augmentation de la raideur passive dans les deux muscles du groupe D à 25 jours. L'analyse histologique a montré, sur le soleus de 25 et 90 jours une augmentation du pourcentage de fibres de type IIa, alors que l'EDL s'enrichit en fibres de type IIb au détriment des fibres de types IIa à 25 et 90 jours. Il y a une réduction de la croissance somatique et un retard de la maturation physique et des réflexes chez les animaux du groupe D. L'analyse de l'activité locomotrice a montré une hyperactivité chez les rats du groupe D à 14 et 17 jours alors qu'à l'âge adulte, il est noté une hypoactivité locomotrice. L'ensemble de ces résultats montre que la dénutrition fœtale provoque de nombreuses altérations de la fonction musculaire et de la maturation somatique et sensorielle. La persistance de certains changements fonctionnels montre que l'ajustement intra-utérin du système muscle-squelettique pourra avoir des conséquences à long terme et compromettre la locomotion de l'animal.

Mots-clé: Dénutrition, "Programming", muscle squelettique, système locomoteur.

ABSTRACT

In this thesis, we studied the effects of intra-uterine undernutrition on the development of locomotor system of rats. It was used offspring from mothers fed either with a control diet (control group – C, 17%, protein) or with a low-protein isocaloric diet (undernourished group - D, 7.8%, protein) during gestation. After birth, all animals received normoproteic diet. At 25 and 90 days of age, the contractile and elastic properties of soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles were studied under isolated conditions. The histological analyses of muscles were also performed. Somatic growth, maturation of physical features, and reflexes of offspring were daily analyzed over the 1st to 21st of age. At 8th, 14th, 17th, 21st and 90th day of age, locomotor activity and the trajectory of animals were examined by the analysis of the movement of animals in a circular field. The D group showed a muscular atrophy, reduced strength, and an increase of shortening maximal velocity of soleus and EDL muscles at 25th and 90th days of age. In the D group, the stiffness of series elastic component was enhanced in the soleus muscles, while EDL muscles showed a decrease at 25th day of age. Similarly, at 25th days of age, D group showed an increase in the passive stiffness of both muscles. The histological analysis showed an increase in the proportion of Type IIa fibers in soleus muscles at 25th and 90th days of age, while EDL showed an increase of type IIb fibers at 25th and 90th days of age. There was a reduction in the somatic growth, as well as a delay in the physical reflex maturation in the D group. The analysis of locomotor activity showed hyperactivity in rats of D group at 14th and 17th days of age. In contrast, it was seen a locomotor hypo-activity in adult age. The data show that fetal undernutrition induces several alterations in the muscle functions and in the somatic and sensorial maturation. The long-term effects of some functional alterations show that the intra-uterine adaptations of skeletal muscles system can impair the locomotion of animal.

Keywords: Undernutrition, Programming, skeletal muscle, locomotor system.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (avec resume en français).....	13
1.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LOCOMOTOR.....	31
1.1.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso relacionado à motricidade.....	31
1.1.2. Desenvolvimento do Sistema Muscular.....	36
1.1.3. Desenvolvimento da Atividade Locomotora.....	41
1.2. DESNUTRIÇÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS SOBRE O SISTEMA LOCOMOTOR.....	43
1.2.1 Programação.....	43
1.2.2. Desnutrição e Sistema Nervoso relacionado à motricidade.....	49
1.2.3 Desnutrição e Sistema Muscular.....	51
1.2.4 Desnutrição e Atividade Locomotora.....	53
1.3. ESTUDO DAS CARACTERISTICAS DO SISTEMA LOCOMOTOR.....	54
1.3.1. Estudo das propriedades mecânicas musculares.....	54
1.3.2. Estudo da maturação somática e da ontogênese reflexa.....	62
2. OBJETIVOS	69
3. HIPÓTESES	70
4. DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA E DESENVOLVIMENTO LOCOMOTOR ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MUSCULARES E DOS ELEMENTOS SOMÁTICOS E SENSORIAIS RELACIONADOS À ATIVIDADE LOCOMOTORA	71
4.1 Estudo das propriedades estruturais e mecânicas do tecido muscular esquelético (avec résumé en Français).....	71
4.1.1. Material e Métodos.....	86
4.1.1.1. Animais e Grupos Experimentais.....	86
4.1.1.2 Preparação dos músculos.....	89
4.1.1.3 Análise histológica.....	90

4.1.1.4 Testes biomecânicos.....	93
4.1.2 Análise dos Resultados.....	105
4.1.3 Discussão.....	120
4.2 Estudo dos indicadores de desenvolvimento somático e sensório-motor (avec résumé en Français).....	131
4.2.1 Material e Métodos.....	136
4.2.1.1. Animais e Grupos Experimentais.....	136
4.2.1. 2. Avaliação do crescimento somático.....	138
4.2.1.3. Análise da maturação das características físicas.....	140
4.2.1.4 Avaliação dos indicadores de desenvolvimento sensório- motor.....	141
4.2.2 Análise dos Resultados.....	143
4.2.3 Discussão.....	148
4.3 Estudo do desenvolvimento da atividade locomotora em ratos (avec résumé en français).....	152
4.3.1. Material e Métodos.....	160
4.3.1.1. Animais e Grupos Experimentais.....	160
4.3.1.2 Análise da atividade locomotora.....	161
4.3.2 Análise dos Resultados.....	167
4.3.3 Discussão.....	178
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES (avec résumé en Français).....	182
6. PERSPECTIVAS (avec résumé en Français).....	193
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	196
ANEXOS.....	228

1.INTRODUÇÃO

RESUMO EM FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

La dénutrition est un problème de santé publique, elle compromet le développement physique et mental de l'individu, en perturbant la croissance économique et sociale des communautés (Chaves, 1978). Les effets nuisibles d'une nutrition inadéquate pendant la gestation et l'allaitement constituent des facteurs du risque sévères pour la santé (Morgane et al., 1993). La dénutrition pendant ces phases peut compromettre définitivement le développement et la croissance de l'individu (Holemans et al., 2003) en programmant des modifications durables dans plusieurs systèmes de l'organisme (Hales et Baker, 2001). La période de gestation a une importance considérable sur le développement du système locomoteur (Maltin et al., 2001). Pendant cette période, le système locomoteur peut souffrir des conditions nutritionnelles défavorables (Gramsbergen et Westerga, 1992). Le grand intérêt pour le système locomoteur implique aussi l'étude de la biomécanique musculaire (Zernicke et Schneider, 1993). Le but de ce travail est donc d'étudier l'impact d'un apport nutritionnel inadapté pendant la gestation. Cet impact sera apprécié par l'étude des caractéristiques mécaniques musculaires, par l'analyse du développement somatique et sensorielle ainsi que par l'examen du développement de l'activité locomotrice.

1.1. DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME LOCOMOTEUR

1.1.1. Développement du système nerveux associé à la motricité

Pendant la vie fœtale, le développement morphologique et fonctionnelle adéquat de la structure nerveuse est indispensable pour l'expression du comportement locomoteur après la naissance (Morgane et al., 1993).

Les neurones moteurs et les fibres musculaires dérivent de tissus embryonnaires différents. Cependant, le contrôle fin du mouvement dépend de la combinaison de ces deux composants de l'unité motrice (Oppenheim, 1991). Après que le contact entre neurones moteurs et cellules musculaires ait été établi, il existe une période de mort cellulaire programmée réduisant le nombre de fibres nerveuses (Oppenheim, 1991). Toute altération dans le développement du tissu musculaire pendant cette phase peut être à l'origine d'une diminution du nombre de neurone moteur par extension ou réactivation de ce processus de mort programmée (Braun et al., 1995).

Par ailleurs, deux périodes sont critiques pour le développement du système nerveux des mammifères. La première période, prénatale, correspond au phénomène de neurogénèse, gliogénèse, migration et différenciation cellulaire (Morgane et al., 1993). Pendant la deuxième période a lieu la croissance rapide du cerveau (Dobbing, 1964; Morgane et al., 1993). Chez le rat, cette deuxième période est entièrement post-natale pendant la phase d'allaitement (Winick et Noble, 1966). Par contre, chez l'homme, cette période débute au troisième trimestre du développement intra-utérin et se termine deux à quatre ans après la naissance. (Morgane et al., 1978; Carver, 1998). Pendant le processus de maturation du système nerveux, les réflexes

primitifs vont être inhibés peu à peu; ces activités passent par une phase de transition aboutissant à la commande volontaire des mouvements (Paine et al., 1964). Chaque réflexe primitif est associé à l'expression du comportement moteur plus élaboré, en d'autres termes, à la posture et aux mouvements (Fox, 1965).

Puisque pendant ces “périodes critiques”, le système nerveux est plus vulnérable aux agressions (Morgane et al., 1978), des répercussions au niveau de l'activité locomotrice volontaires pourront être attendues.

1.1.2. Développement du système musculaire

La myogénèse est un processus complexe qui a pour origine les cellules dorsales du mésoderme. Ces cellules subissent différents processus de différenciation jusqu'à la formation de myoblastes (Buscher et Belmonte, 1999) (Figure 1). Ensuite, les myoblastes fusionnent pour constituer une cellule polynucléée fusiforme: le myotube (Barbet et al., 1991). Les myotubes se distinguent par leur contenu en différents types de myosine (Barbet et al., 1991). Les myotubes primaires, à l'origine des fibres lentes, apparaissent entre le 14^{ème} et le 16^{ème} jour embryonnaires chez le rat et entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation chez l'homme (Rubinstein e Kelly, 1981; Condon et al., 1990; Barbet et al., 1991). Les myotubes secondaires, qui apparaissent après le 17^{ème} jour chez le rat ou après la 8^{ème} semaine chez l'homme sont quant à eux à l'origine des fibres rapides (Rubinstein e Kelly, 1981; Condon et al., 1990; Barbet et al., 1991).

Il a été rapporté par différents auteurs que le nombre de fibres musculaires est fixé à la naissance (Ontell e Dunn, 1978; Ontell e Kozeka, 1984). Cependant, des processus d'hyperplasie après la période post-natale ont été mis en évidence (Rayne et Crawford, 1975; Tamaki et al,

1992, Tamaki et Uchiyama, 1995). Pendant la croissance, le muscle augmente en longueur et en épaisseur afin de croître avec le squelette (Maltin et al., 2001).

Une des caractéristiques du muscle strié squelettique est sa composition en différentes isoformes de chaîne lourde de myosine (MHC). Cependant, à la naissance, la proportion dans ces différentes isoformes n'est pas fixée. Chez le rat, l'apparition des MHC de type I dans les muscles lents comme le soleus dans le troisième semaine post natale coïncide avec la diminution des isoformes embryonnaires (Adams et al, 1999). Dans les muscles rapides, la conversion des isoformes néonatales en isoformes rapides a été observée pendant le deuxième semaine post natale (Butler-Brown et al, 1982). Chez le rat, ce processus aboutit à un profil myotypologique bien défini au sevrage, ce profil étant à mettre en relation à la fonction du muscle (Agbulut et al, 2003 ; Punkt et al, 2004). Quoi qu'il en soit, de nombreuses études ont mis en évidence, chez l'adulte, l'importante plasticité de muscle strié squelettique (Pette et Vrbova, 1985; Grambke et al., 1983). Ainsi, des adaptations dans les proportions des différents types de fibres peuvent être observées chez le rongeur adulte suite à des modifications du statut hormonal, contractile, nerveux ou nutritionnel (Goubel et Marini, 1987 ; Canon et Goubel, 1995 ; Li et Larsson, 1997 ; Pette et Vrbova, 1985; Bedi et al., 1982) et avoir des répercussions au niveau fonctionnel.

1.1.3. Développement de l'activité locomotrice

Dans chaque espèce, les événements en rapport avec le développement moteur suivent une séquence caractéristique et prédéterminée (Fox, 1965; Smart et Dobbing, 1971; Gramsbergen, 1998). Grâce à l'utilisation de technique échographique chez l'homme, il a été mis

en évidence que certains modèles moteurs, semblables à ceux décrits chez le nouveau-né, existent dès la vie fœtale (Milani-Comparreti, 1980). Après la naissance, il existe une période initiale de mouvements réflexes, les réflexes primitifs, qui permettront l'acquisition plus tardive des mouvements volontaires (Fox, 1965). Ainsi, l'ensemble des composants nerveux pour la production de différents comportements moteurs semble être disponible très tôt (Milani-Comparetti, 1980; De Vries et al., 1982).

Chez le rat, dès la fin de la deuxième semaine de vie post-natale, les mouvements et l'activité locomotrice se rapprochent de ceux observés chez l'adulte (Fox, 1965), les différences devenant pratiquement inexistantes à l'âge du sevrage (Walton et al. 1992). Cependant, ces modèles de mouvement et de locomotion se développent encore jusqu'à la maturation sexuelle, avec perfectionnement de la coordination (Walton et al. 1992).

1.2. DENUTRITION ET SES CONSÉQUENCES SUR LE SYSTÈME LOCOMOTEUR

1.2.1. “Programming”

Le développement du fœtus et du nouveau-né est influencé grandement par de nombreux facteurs endogènes et exogènes. Parmi ces facteurs exogènes, le statut alimentaire joue un rôle majeur (Morgane et al., 2002). La disponibilité d'éléments nutritifs au fœtus est déterminée par la composition du corps de la mère à la conception et par son alimentation pendant la grossesse (Bonimonte, 1999). Les études épidémiologiques chez l'homme et les études expérimentales chez l'animal ont rapporté que les stimuli de l'environnement se produisant pendant la période critique de développement (foetal, néonatal ou enfance) ont des conséquences à long terme pendant la vie adulte (Hales et Barker, 1992; Ozanne et al., 1998). Si la croissance d'un fœtus est influencée par ses gènes, elle est aussi limitée par l'apport des nutriments et de l'oxygène (Barker, 1999). Il a été suggéré des associations entre le faible poids à la naissance et les gènes qui déterminent la faible croissance foetale et les maladies plus tardives (Barker, 1999). Le mécanisme associé à ces effets est appelé “programmation”; où une agression de l'environnement pendant la période critique de développement aurait des effets permanents sur la structure et la fonction des organes (Lucas et al., 1991). “La programmation” du fœtus peut ainsi résulter d'adaptations invoquées quand l'apport nutritionnel materno-placentaire est inférieur à la demande nutritive foetale (Lucas et al., 1999). Le statut alimentaire pendant la période critique

de développement est alors considéré comme un inducteur important de “la programmation” chez les animaux et les êtres humains. Chez les êtres humains, plusieurs études épidémiologiques ont fourni le support à l'association entre le faible poids de naissance et les maladies métaboliques à la vie adulte (Hales et Barker, 1992 ; Phillips et al., 1994 ; Ravelli et al., 1998 ; Yajnik, 2000).

1.2.2. La dénutrition et le système nerveux associé à la motricité

La nutrition périnatal peut influencer le processus de maturation nerveuse (Morgane et al., 2002; Chang et al., 2003; Hernandes et Almeida, 2003). Pendant les périodes critiques de développement, la dénutrition produit des effets sur la neurogenèse ainsi que sur la migration et la différenciation cellulaire (Morgane et al., 1993). La dénutrition provoque aussi une réduction du nombre (Rosso et al., 1970; Bedi, 2003) et de la forme (Resnick et al., 1979; Borba et al., 2000) neuronale. Des changements dans les proportions des différents types de cellules neuronales et gliales sont aussi observés (Morgane et al, 1993). Un retard dans le processus de myélinisation, un ralentissement de la mort neuronale programmée et de la perte dendritique sont des phénomènes qui ont également été rapportés (Noback et Eisenman, 1981). Enfin, la diminution de la taille et du poids cérébral après dénutrition précoce a été montré par plusieurs études (Leuba et Rabinowicz, 1979; Marin et al, 1995; Kehoe et al., 2001).

Les altérations du système nerveux liées à la dénutrition a des répercussions au niveau comportemental. Parmi les modifications, il est observé des changements de l'agressivité

(Levitsky et Barnes, 1972), ces réponses émotionnelles étant exacerbées en conditions stressantes. Les processus d'attention perturbés chez les dénutris rendent difficile les interactions de l'organisme avec l'environnement, induisant fréquemment des problèmes d'apprentissage (Morgane et al., 1993). En plus, des retards de l'ontogénèse des réflexes (Barros et al., 2006) et de l'évolution de locomotion (Barros et al., 2006) ont été observés chez le rat mal-nourri.

1.2.3. Dénutrition et système musculaire

Des enquêtes récentes ont montré les effets de la dénutrition précoce sur le développement musculaire (Ozanne et al., 1996; Ozanne et al., 2003). La période intra-utérine est critique pour le développement musculaire du nouveau-né (Wilson et al., 1988). Ainsi, la dénutrition dans la période foetale peut induire des modifications structurelles et fonctionnelles ultérieures dans le muscle squelettique (Bedi et al., 1982; Barros et al., 2004; Toscano et al., 2006). Parmi celles-ci, sont observés une baisse du poids musculaire (Bedi et al., 1982; Barros et al., 2004; Toscano et al., 2006), des altérations structurelles au niveau du sarcomère (Oumi et al., 2000).

Du point de vue des propriétés contractiles, au niveau des fibres du diaphragme, Prakash et al (1993) rapportent une diminution de la force relative développée chez le rat dénutri pendant la gestation alors que Brozanski et al (1993) ne trouvent aucune modification chez les animaux dénutris pendant la gestation et l'allaitement. Par contre, Wareham et al (1982) trouvent une

augmentation de la force tétanique relative développée par le soleus et l'Extensor Digitorum Longus de rats de 12 mois dénutris pendant le développement fœtal et l'allaitement.

Enfin, plusieurs travaux ont rapportés des modifications des caractéristiques histologiques des muscles d'animaux dénutris pendant la période critique de développement (Bedi et al., 1982 ; Lefaucher et al., 2003 ; White et al., 2000 ; Zhu et al., 2006). Cependant, l'ensemble de ces travaux montre une inhomogénéité dans les résultats rapportés (Bedi et al., 1982 ; Lefaucher et al., 2003 ; Zhu et al., 2006). La dénutrition pendant la gestation et l'allaitement ne change pas la proportions des types de fibres dans le muscle soleus mais augmente les fibres de type I et de type IIa et diminue les fibres de type IIb dans le muscle EDL de rat au 180^{ème} jour de la vie (Bedi et al., 1982). La dénutrition pendant la première semaine post-natale augmente les fibres de types I et retarde la diminution des fibres de types IIa dans le muscle longuissimo dorsale des porcs (Lefaucher et al., 2003). La dénutrition pendant la gestation, par contre, augmente les fibres de type IIb et diminue les fibres de type IIa dans le muscle longuissimo dorsale des brebis (Zhu et al., 2006).

1.2.4. Dénutrition et activité locomotrice

Il existe aujourd'hui de nombreuses preuves sur les effets délétères de la dénutrition précoce sur le développement infantile, et en particulier sur l'évolution du comportement moteur

(Benitez-Bribiesca, 1999; Grantham-McGregor et al., 1987; Drewett et al. 2001). Chez le jeune rat, la dénutrition entraîne un retard de la dispersion de la portée qui est un indicateur de troubles du développement (Massaro et al., 1974). En plus, un environnement défavorable pendant la période prénatale peut conduire à un développement anormal du comportement alimentaire et à une diminution de l'activité physique chez le rat jeune et adulte (Vickers et al., 2003).

Chez l'homme, les retards dans le développement psychique et moteur peuvent aussi être associés à la dénutrition précoce et produire un ensemble de déficits cognitifs et comportemental tout au long de la vie (Wachs, 1995).

1.3. ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DU SYSTEME LOCOMOTEUR

1.3.1. Etude des propriétés mécaniques musculaires

L'analyse des propriétés mécaniques du muscle squelettique peut être accomplie à travers un modèle à trois composantes (Figure 2). Ce modèle est constitué par une composante contractile (CC), une composante élastique en série (CES) et une composante élastique en parallèle (CEP) (Shorten, 1987).

La CC, représentant le générateur de tension, correspond aux ponts actine-myosines. La tension tétanique maximale développée par le muscle en condition isométrique et la force

maximale produite pendant la secousse sont des paramètres utilisés communément pour caractériser cette composante. Le temps de contraction ainsi que le temps de demi-relaxation, en étroite relation avec le cinétique des mouvements calciques dans la fibre musculaire, rend compte également des caractéristiques de la CC. En outre, au niveau d'un même muscle, ces paramètres peuvent aussi être influencés par des modifications des caractéristiques de la CES. Un autre paramètre caractéristique de la CC est la vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}). Cette caractéristique est fonction de l'activité de la myosine ATPase et une corrélation entre sa valeur et le pourcentage de MHC rapide dans le muscle a été rapportée (Reiser et al., 1985). Signalons également que l'architecture musculaire, c'est-à-dire l'angle de pennation, peut influencer la V_{max} (Vandewalle, 1992).

La CES, élément de transmission de la force contractile, lie la CC à la périphérie. Cette composante est divisée en une partie active, localisée au niveau des ponts actine-myosines, et en une partie passive, localisée dans les structures tendineuses (Hill, 1951). Ainsi, des modifications dans les paramètres de raideur de la CES peuvent être attribuées à des changements se produisant aussi bien dans la partie passive que dans la partie active de la CES. Grâce à l'utilisation de modèles animaux (entraînement ou inactivité) produisant une adaptation des propriétés histologiques musculaires, il a été montré qu'une augmentation de la proportion de fibre lente s'accompagne d'une augmentation de raideur de la CES ; à l'opposé, un enrichissement du muscle en fibre rapide est associé à une diminution de raideur de cette composante élastique (Goubel et Marini, 1987; Pousson et al, 1991; Almeida-Silveira et al., 1994; Canon et al, 1995).

La CEP participe au développement de la force passive du muscle en présentant une certaine résistance à l'étirement. Cette composante est donc caractérisée lors de tests d'étirement en condition passive, c'est-à-dire lorsque le muscle ne se contracte pas. Les caractéristiques mécaniques de la CEP sont dues à plusieurs sources d'éléments élastiques positionnés en

parallèle par rapport qu générateur de force. Ainsi, le comportement de la CEP peut être attribué au tissu conjonctif et au contenu en collagène du muscle, aux interactions résiduelles entre les protéines d'actine et de myosine mais aussi aux protéines de connexion telle que la titine ou la nébuline (Hill, 1968, Kovanen et al., 1984, Wang et al, 1993 ; Anderson et al, 2000).

1.3.2. Etude de la maturation somatique et de l'ontogénèse réflexe

Au cours de la croissance et du développement, le système nerveux des mammifères présente des phases d'intenses changements structuraux et fonctionnels. Plusieurs facteurs de l'environnement, y compris la nutrition, peuvent modifier, adapter ou orienter ce développement (Nishi, 1994). Il existe des changements drastiques tant fonctionnels que morphologiques dans les neurones lorsque ces agressions se produisent lors d'une période de vulnérabilité (Noback e Eisenman, 1981; Manhães de Castro et al., 2001). Une des altérations la plus étudiée est la dénutrition. La dénutrition néonatale est associée à une variété de déficits cognitifs et comportementales au cours de la vie (Wachs, 1995). L'alimentation va fournir l'énergie et les nutriments nécessaires à la maturation structurale et au développement fonctionnel du système nerveux (Morgane et al., 1993). La carence nutritionnelle dans cette période peut induire des défauts morphogénétiques avec des conséquences délétères pour le développement et l'acquisition des processus physiologiques mûrs (Dobbing, 1964; Winick e Noble, 1966; Noback e Eisenman, 1981). Dans le système nerveux, la dénutrition peut produire des altérations chimiques et structurels qui seront consolidés dans les tissus adultes (Morgane et al., 1978). Ces

changements peuvent être responsable d'ajustements fonctionnels, en particulier sur l'expression comportementale (Wauben e Wainwright, 1999). Plusieurs régions du cerveau importantes pour le contrôle de certains comportements peuvent être endommagées de façon irréversible par la dénutrition au début de la vie (Plagemann et al., 2000a). Ainsi, le comportement, expression maximale de la fonction nerveuse, dépend du développement adéquat de certaines régions du système nerveux. Lorsque les agressions se concentrent pendant les périodes critiques ontogénétiques de ce système, le développement ultérieur est compromis, donc les comportements peuvent être modifiés (Morgane et al, 1978).

Des études chez les animaux et chez l'homme ont montré l'importance des analyses de la maturation somatique pour évaluer la croissance et le développement ainsi que l'état nutritionnel (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1970; Barker et al., 1993). Chez l'homme, les évaluations du poids, la hauteur et le périmètre céphalique en rapport avec l'âge sont largement utilisées (OMS, 1995). Le périmètre céphalique chez l'homme est lié à la taille du cerveau (Ivanovic et al., 1995; Weaver e Christian, 1980) et il est prouvé que cette donnée peut refléter des carences nutritionnelles qui ont eu lieu au début de la vie (Malina et al., 1975; Spurr et al., 1983). Chez le rat, il existe des mesures similaires de la croissance somatiques et des caractéristiques physiques (Smart e Dobbing, 1971; Silva et al., 2005; Deiró et al., 2006). Différentes études ont évalué la maturation des caractéristiques physiques comme: l'ouverture du pavillon auditif, l'ouverture du conduit auditif, l'irruption des incisives supérieures, l'irruption des incisives inférieures ou encore l'ouverture des yeux pendant le développement somatique (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Deiró et al., 2006). La dénutrition néonatale est capable de réduire les mesures de croissance somatique et de retarder l'apparition des caractéristiques physiques (Silva et al., 2006). Les mesures de maturation somatique caractérisent ainsi non seulement le développement du

cerveau, mais aussi celui du corps et sont des indicateurs du développement normal (Silva et al., 2006).

Ainsi, le développement post-natal implique la maturation des différents systèmes (Fox, 1965). Des tests neurologiques et comportementaux servent aussi d'indicateurs du développement normal. Dans le travail de Fox (1965) chez la souris, plusieurs réponses réflexes peuvent être prises comme référence: préhension palmaire, récupération du décubitus, placement par les vibrissae, aversion au précipice, géotaxie négative, réponse au bruit et réaction de redressement pendant la chute. Aussitôt la naissance, les réponses sont faibles et lentes (Fox, 1965). À partir du deuxième jour de vie, chez la souris, ces réponses deviennent fortes et vigoureuses, en particulier celles qui sont en rapport avec l'orientation corporelle et la localisation du téton de la mère comme la réponse de récupération du décubitus et de géotaxie négative (Fox, 1965). Les réflexes de récupération du décubitus et de géotaxie négative sont en rapport avec les modèles de locomotion de la souris nouveau-né (mouvements de traquer et "pivoting") (Fox, 1965). Le "pivoting" semble être un type d'activité locomotrice de recherche, tandis que le traquer est une réponse à un stimulus ciblé unidirectionnel (Fox, 1965). Parmi les réflexes, certains sont en rapport avec la survie de l'animal comme l'aversion au précipice. Au départ, ces réponses sont faibles, mais au cours du développement musculo-squelettiques des animaux, elles deviennent fortes et sont facilement reconnues (Fox, 1965). Le réflexe de préhension palmaire simule la réponse de Babinski chez l'homme (Fox, 1965). Les réflexes de réponse au bruit, placement par les vibrissae, réaction de redressement pendant la chute, cependant, ont besoin d'un développement plus important des systèmes organiques. Fox (1965) réfère que le développement de l'audition est nécessaire pour la réponse au bruit, tandis que pour les réflexes de placement par les vibrissae et la réaction de redressement pendant la chute, les animaux ont besoin d'une plus grande coordination motrice, afin qu'ils puissent les accomplir. L'étude du

modèle de maturation réflexe est donc utilisé pour démontrer la maturation appropriée du système nerveux central au cours du développement (Smart et Dobbing, 1971).

Les réflexes primitifs sont constitués par des réponses involontaires, dont beaucoup sont manifestes, même avant la naissance (Mandich et al., 1994; Ungerer et Sigman, 1983). Ces réflexes sont intégrés dans les comportements volontaires développés plus tardivement, et sont les unités de base de la coordination à partir desquels seront possibles les organisations plus complexes du comportement (Olhweiler et al., 2005). L'étude de l'ontogénèse réflexe est donc d'une grande importance pour l'évaluation de l'intégrité fonctionnelle de l'individu (Olhweiler et al., 2005), vue qu'elle représente une étape initiale du développement moteur et servira de base pour l'étude de l'évolution de l'activité locomotrice.

2. Objectifs

Général

Évaluer les répercussions de la dénutrition intra-utérine sur le développement du système locomoteur chez le rat.

Spécifiques

- ❖ Accomplir l'analyse histologique pour observer l'effet de la dénutrition intra-utérine sur la distribution de différents types de fibres musculaires au sevrage et à l'âge adulte.

- ❖ Accomplir l'analyse des propriétés mécaniques de deux muscles différents, le soleus (muscle postural) et l'Extensor Digitorum Longus (EDL, muscle phasique) au 25° et 90° jour de vie post-natal, après la dénutrition gestationnelle.
- ❖ Évaluer le développement somatique et sensori-moteur, après l'agression gestationnelle nutritionnelle, à travers la vérification du développement des caractéristiques physiques et de l'ontogenèse de réflexes pendant la période néonatale;
- ❖ Analyser le développement de l'activité locomotrice de la période de l'allaitement jusqu'à l'âge adulte;
- ❖ Évaluer les répercussions précoces et tardives de l'agression nutritionnelle pendant la gestation.

3. Hypothèses

- ❖ La dénutrition prénatale entraîne des changements persistants dans les proportions des types de fibres des muscles soleus et EDL.
- ❖ La dénutrition prénatale est à l'origine de modifications persistantes des propriétés mécaniques.
- ❖ Le retard dans la maturation des caractéristiques physiques, dans l'ontogenèse des réflexes et les changements dans la structure et la fonction des muscles squelettiques suite à la dénutrition prénatale influencent le développement de l'activité locomotrice.
- ❖ Les modifications de l'activité locomotrice liées à la dénutrition prénatale sont persistantes jusqu'à la vie adulte.

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde pública que compromete o desenvolvimento físico e mental do indivíduo, interferindo no crescimento econômico e social das comunidades (Chaves, 1978). Numa tendência iniciada nos anos 70, a desnutrição infantil segue em queda no Brasil, mas ainda está associada à mortalidade de muitas crianças anualmente (FAO, 2000; Batista-Filho e Rissin, 2003; Unicef, 2006). Grande parte das crianças atingidas pela desnutrição consegue sobreviver, esses indivíduos são classificados como portadores de desnutrição pregressa (Santos et al., 1995).

Os efeitos deletérios de uma nutrição inadequada durante a gestação e a lactação constituem severos fatores de risco para a saúde (Morgane et al., 1993). Evidências epidemiológicas mostraram que a desnutrição durante a vida fetal e a infância predispõe à doenças na vida adulta (Forsdahl, 1977). Esse processo estaria relacionado a um mecanismo chamado “programação” em que um estímulo ambiental durante um período crítico do desenvolvimento, tem efeitos permanentes na estrutura e função do organismo (Lucas, 1991). A desnutrição durante essas fases poderá comprometer de forma definitiva o desenvolvimento e crescimento de um ser vivo (Holemans et al., 2003). O período gestacional é de grande importância para o desenvolvimento do sistema locomotor (Maltin et al., 2001). Uma nutrição adequada é essencial para o bom desenvolvimento desse sistema (Gramsbergen e Westerga, 1992). Em condições nutricionais desfavoráveis, tanto o crescimento quanto a adaptação funcional do sistema locomotor pode sofrer repercussões negativas (Gramsbergen e Westerga, 1992).

Dentre os mamíferos, o ser humano executa de forma particular uma extensa gama de movimentos funcionais, com alto grau de controle e grande plasticidade (Smith et al., 1997). No tocante à avaliação da maturidade do sistema nervoso do lactente é digno de nota o comportamento reflexo. O crescente interesse pelo desenvolvimento motor focaliza também a biomecânica do desempenho motor (Zernicke e Schneider, 1993).

O músculo esquelético representa cerca de 40% da massa corporal total (Maltin et al., 2001). Os músculos desempenham tanto um trabalho dinâmico, que permite a locomoção e o posicionamento dos segmentos corporais no espaço, quanto um trabalho estático, responsável pela manutenção da postura corporal (McComas, 1996). Além disso, pode ser usado como um reservatório de aminoácidos que o organismo pode lançar mão diante da necessidade (Maltin et al., 2001). O desempenho muscular está relacionado à sua massa e sua capacidade funcional em termos de sua habilidade para gerar força, velocidade e duração do movimento (Maltin et al., 2001).

Estudos são necessários para se compreender como a programação fetal pode influenciar o desempenho do adulto posteriormente (Ozanne et al., 1996; Ozanne et al., 2003). Nesse trabalho serão investigadas alterações estruturais e funcionais envolvidas no sistema locomotor diante da desnutrição pré-natal capaz de programar alterações em diversos sistemas do organismo.

1.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LOCOMOTOR

1.1.1. Desenvolvimento do Sistema Nervoso relacionado a motricidade

Em mamíferos, o crescimento estrutural e o desenvolvimento cumprem as etapas de maturação de forma muito semelhante (Morgane et al., 1978; Morgane et al., 1993). Em particular, os estudos dos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos desses organismos, contribuem sobretudo para melhor compreender a ontogênese do sistema nervoso (SN) (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Takakusaki, 2008). O desenvolvimento morfofuncional adequado da estrutura nervosa é a base para a expressão locomotora nesses indivíduos (Morgane et al., 1993).

Eventos sequenciais apresentados pelo SN durante o desenvolvimento pré e pós-natal, determinam a composição neuroquímica e a estrutura morfofuncional definitivas presentes no adulto (Morgane et al., 1993; Morgane et al., 2002). O crescimento celular em qualquer sistema, inclusive o SN, é caracterizado por importantes etapas classicamente conhecidas como fase de hiperplasia, hiperplasia com hipertrofia e fase de hipertrofia respectivamente (Winick, 1972; Morgane et al., 1993). Como a estrutura do SN não é homogênea, a proliferação celular varia em intensidade, de acordo com a região, o tipo celular e a etapa do desenvolvimento (Winick, 1972; Morgane et al., 1993). No cérebro de ratos, a divisão celular vai até os 21 dias após o nascimento; já no cerebelo, não ultrapassa os 16 ou 17 dias (Morgane et al., 1978).

No início da vida do Homem há intensos e velozes processos de crescimento e desenvolvimento dos tecidos neurais, estes períodos e seus eventos são críticos na construção do

organismo (Morgane et al., 1993). No homem, as camadas do córtex cerebral são finalizadas durante os últimos meses da gestação e nos primeiros meses após o nascimento (Thelen et al., 1987). Parece que ao nascer e no ambiente intra-uterino, no período embrionário e principalmente no período fetal, os humanos temos muito mais células nervosas do que vamos utilizar ao longo da vida e que esse excesso será posteriormente destruído (Waters et al., 1994). Se considerarmos os primatas, o número de neurônios é bem maior no nascimento do que o número utilizado durante a vida toda (Waters et al., 1994). Se pensarmos nos axônios, essa diferença também é similar. O mesmo acontece com os dendritos, prolongamentos ramificados do corpo celular dos neurônios, que recebem a informação nervosa (Waters et al., 1994). Ao final do primeiro ano de vida no homem a densidade das sinapses é máxima, diminuindo para as densidades encontradas nos adultos aproximadamente aos sete anos de idade (Thelen et al., 1987). A redução do número de neurônios parece ser um processo ativo, determinado pela genética (Thelen et al., 1987).

Os neurônios motores inferiores e as fibras musculares derivam de tecidos embrionários bastante diferentes, mas o controle fino do movimento depende da correspondência precisa entre esses dois componentes da unidade motora (Oppenheim, 1991). Logo depois que os neurônios motores da medula espinhal e do tronco encefálico entram em contato as células musculares, sofrem um período de morte celular programada que reduz o número de neurônios em cerca de 50% (Oppenheim, 1991). Acredita-se que essa redução ligeiramente agressiva seja necessária para que o número de neurônios motores corresponda ao músculo (Oppenheim, 1991). O aumento na quantidade de músculo disponível leva à maior sobrevivência dos neurônios motores, enquanto a redução aumenta a morte dos neurônios motores (Oppenheim, 1991). O desenvolvimento defeituoso do músculo nessa fase crítica pode estender ou reativar a morte programada de neurônios motores (Braun et al., 1995).

No SN dos mamíferos, existe um primeiro período crítico que é pré-natal e se refere à neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular (Morgane et al., 1993). Há também um segundo período crítico correspondente ao crescimento rápido do cérebro, com mielinização, sinaptogênese evidentes e os eventos tardios da neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular (Dobbing, 1964; Morgane et al., 1993). No rato, todo este segundo período é pós-natal durante a fase de aleitamento (Winick e Noble, 1966). Já no homem, inicia-se no terceiro trimestre do desenvolvimento intra-uterino, continuando-se por dois a quatro anos após o nascimento (Morgane et al., 1978; Carver, 1998). Durante os períodos críticos de desenvolvimento, fatores intrínsecos e extrínsecos (epigenéticos) parecem ativar genes de maneira seqüencial em momentos diferentes (Abrous et al., 2005). Dentre esses vários fatores se incluem os ambientais e os não celulares que podem modificar, modular ou direcionar eventos subseqüentes da cadeia do desenvolvimento no organismo (Abrous et al., 2005).

Durante os “períodos críticos” do desenvolvimento do SN, este sistema parece estar mais vulnerável a agressões (Morgane et al., 1978). A vulnerabilidade do SN às injúrias ambientais durante o seu desenvolvimento estaria, dentre outros fatores, relacionada ao potencial do agente agressor e também ao período de exposição deste sistema a essas agressões (Rice e Barone, 2000). Embora saibamos que o sistema nervoso humano e de outros mamíferos é extremamente flexível e plástico, várias evidências experimentais e clínicas demonstram que agressões nestes períodos críticos podem modificar os eventos ontogenéticos seqüenciais com efeitos diversos e persistentes (Dobbing, 1970; Morgane et al., 1993, Manhães de Castro et al., 2001, Barreto-Medeiro et al., 2002; Deiró et al., 2006).

O desenvolvimento motor seguiria uma seqüência rígida da reação reflexa ao comportamento voluntário, sendo os reflexos inibidos à medida que ocorre a maturação dos centros superiores (Zernicke e Schneider, 1993). Assim, durante o processo de maturação do

sistema nervoso central (SNC) ocorre mielinização, arborização e formação de sinapses das células nervosas, que aos poucos vão inibindo as atividades reflexas primitivas, passando por uma fase de transição e, por último, assumindo o comando voluntário dessas atividades (Paine et al., 1964). Significando a etapa inicial na organização sensório-motora, os reflexos primitivos, da mesma forma que no ser humano, favorecem no rato suas primeiras movimentações no meio externo, com função de estimulação sensorial e proprioceptiva (Fox, 1965; Barros et al., 2006). Se analisados em detalhe, pode-se perceber o quanto cada reflexo primitivo se relaciona com a expressão comportamental motora mais elaborada; ou seja, à postura e aos movimentos (Fox, 1965).

Durante os primeiros dias de vida no rato, as atividades locomotoras caracterizam-se por uma inter-relação entre a expressão de padrões rítmicos de movimento e a ação do sistema vestibular, diante das necessidades atribuídas à gravidade (Clarac et al, 1998). A partir do controle da cabeça e dos membros anteriores adquiridos na primeira semana pós-natal, segue-se uma maturação funcional mais rápida dos membros posteriores, a maturação da locomoção evolui no sentido rostro-caudal (Clarac et al, 1998; Vinay et al, 2005).

No rato, a maioria das projeções descendentes do cérebro alcança a medula dias antes do nascimento, entre elas encontram-se as vias retículo e vestibuloespinais, e as projeções serotoninérgicas e noradrenérgicas, envolvidas na iniciação e na modulação de padrões motores (Lidov e Molliver, 1982; Clarac et al, 2004). Projeções essas que são apenas parcialmente funcionais embora possam ativar padrões motores rítmicos semelhantes ao movimento de nadar ou rastejar; todavia, por volta do final da segunda semana pós-natal, seu desenvolvimento estará completo (Clarac et al., 2004). Assim, seguindo a maturação do sistema vestibular, das vias descendentes e da regulação dos reflexos posturais, a marcha ou a corrida, atividades locomotoras

mais complexas, desenvolver-se-ão a partir desta época pós-natal (Brocard et al, 1999; Clarac et al 2004). Com as modificações intrincadas e interligadas que acompanham o processo de crescimento e desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, aprimoram-se as habilidades funcionais (Purves, 1994; Burns, 1999, Massion, 1998).

O desenvolvimento motor é o processo de mudança no comportamento motor, o qual está relacionado à idade, com a postura e com o movimento (Goldberg e Sant, 2002). O comportamento locomotor depende de fatores como a intenção do ser e do seu estado emocional (Takakusaki, 2007). A posição bípede no ser humano é construída desde o nascimento, através de sensações de movimento (Bril, 1997). Embora haja um esquema pré-estabelecido geneticamente para a formação desta postura (Bril, 1997), os reflexos primitivos exprimem as manifestações iniciais do neonato, esses evoluirão posteriormente para comportamentos mais elaborados e definitivos (Bly, 1996; Bril, 1997; Massion, 1998; Schmid et al, 2005). Para o desempenho motor ótimo, no entanto, é necessário não apenas o desenvolvimento adequado do SN, mas que o muscular o seja também.

1.1.2. Desenvolvimento do Sistema Muscular

O músculo esquelético é essencial para a locomoção e manutenção da postura (Lefaucher et al., 2003). As células primordiais do mesênquima responsáveis pela formação do tecido muscular estriado esquelético passam por um processo de citodiferenciação, formando o mioblasto (Buscher e Belmonte, 1999) (Figura 1). As células nesse estágio intermediário já são caracterizadas como estruturas diferenciadas dentro da linhagem miogênica, sendo designadas células precursoras miogênicas (CPMs) (Cornelison e Wold, 1997; Seale e Rudnicki, 2000).

A progressão de uma célula do mesênquima, por meio dos estágios de determinação, proliferação, citodiferenciação e ativação do programa genético muscular específico, são reguladas pela expressão orquestrada de fatores de transcrição (FT) específicos, conjuntamente conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (FRMs) (Hawke e Garry, 2001). Entre eles, destacam-se os membros da família Myo-D, representada pelos fatores Myo-d, myf-5, MRF-4 e miogenina (Hawke e Garry, 2001). O papel específico de cada um desses FT sobre a miogênese, assim como durante a regulação gênica das células maduras, têm sido alvo de investigação, considerando-se a incompleta compreensão de suas funções (Hawke e Garry, 2001). Acredita-se que os fatores Myo-D e myf-5 estejam relacionados aos processos de determinação e proliferação das CPMs, sendo os demais relacionados à fase de diferenciação terminal e fusão (Cornelison e Wold, 1997; Seale e Rudnicki, 2000).

Logo após, a diferenciação das células mesenquimais em mioblastos, essas células primordiais se fundem para formar estruturas cilíndricas, alongadas e multinucleadas – os miotubos (Barbet et al., 1991) (Figura 1). Os miotubos, que se formam a partir da fusão dos

mioblastos, se distinguem por seu conteúdo em diferentes tipos de miosina (Barbet et al., 1991). Os miotubos primários aparecem, em ratos entre o 14º dia e o 16º dia embrionário ou no homem entre a 6ª e a 8ª semanas de gestação e dão origem as fibras lentas (Rubinstein e Kelly, 1981; Condon et al., 1990; Barbet et al., 1991). Os miotubos secundários começam a aparecer a partir do 17º embrionário no rato e a partir da 8ª semana de gestação no homem e dão origem as fibras de contração rápida (Rubinstein e Kelly, 1981; Condon et al., 1990; Barbet et al. 1991).

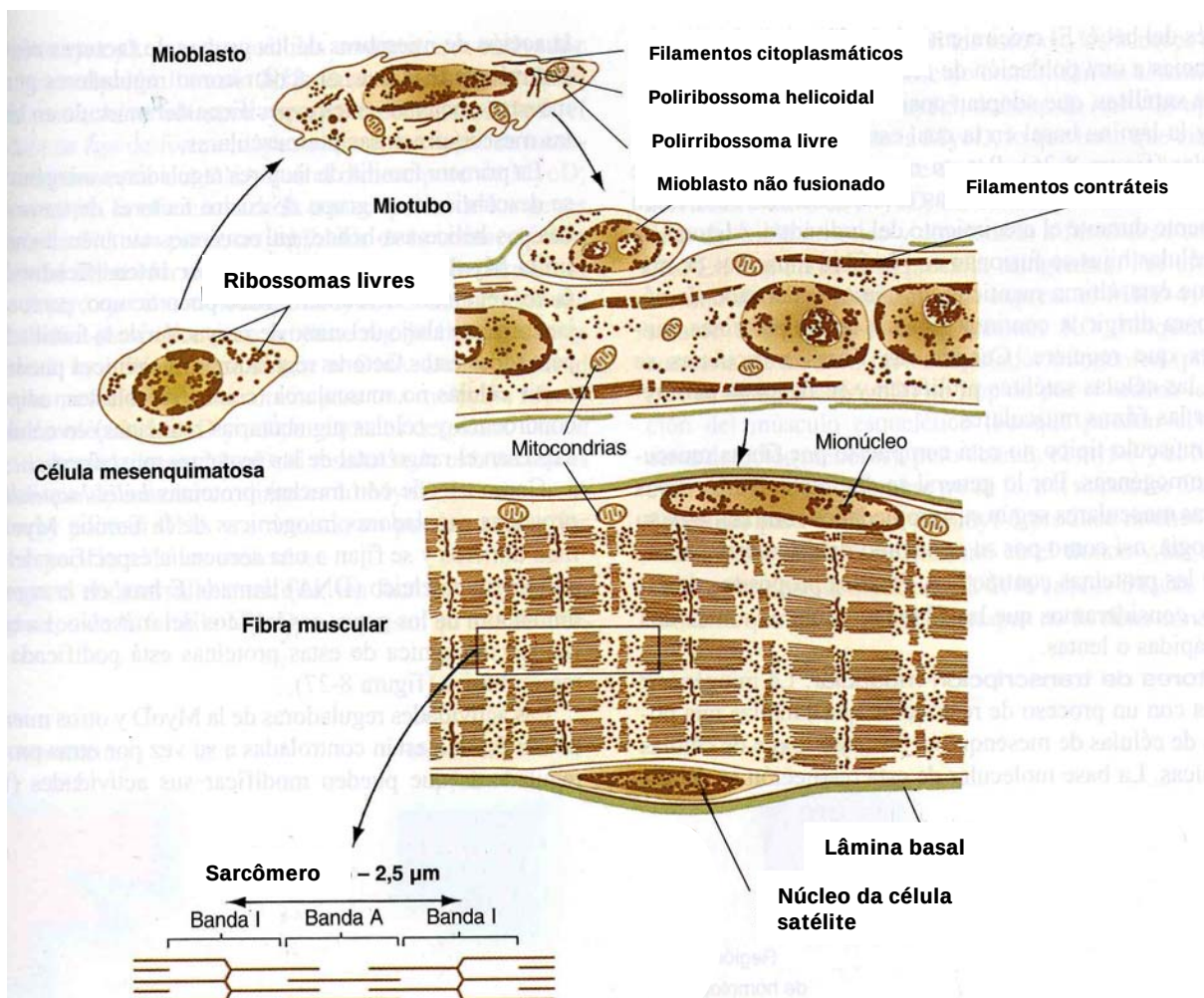


Figura 1. Formação das fibras musculares a partir de células primordiais do mesênquima (segundo Carlson, 2005).

A massa muscular depende do número e tamanho das fibras musculares (Maltin et al., 2001). Autores referem que antes ou logo após o nascimento encerra-se a formação de novas fibras musculares (Ontell e Dunn, 1978; Ontell e Kozeka, 1984). No entanto, foi evidenciado aumento no número de fibras musculares após o período pós-natal e a ocorrência de hiperplasia e regeneração do músculo na idade adulta (Rayne e Crawford, 1975; Tamaki et al, 1992, Tamaki e Uchiyama, 1995). Ao longo da miogênese, nem todos os mioblastos se diferenciam em fibra muscular, alguns permanecem unidos às fibras musculares sem se diferenciar (Barbet et al., 1991). Eles devem dar origem às células satélites que poder intervir notadamente no crescimento pós-natal do músculo e na reconstituição das fibras lesadas (Koishi et al., 1994; Fuchtbauer et al., 1992) (Figura 1). As células satélites continuam a contribuir para a hiperplasia quando o músculo é submetido a processos de treinamento ou aumento de atividade (Tamaki et al, 2002).

Os músculos aumentam em comprimento e em espessura a fim de crescerem junto com o esqueleto (Maltin et al., 2001). A hipertrofia das fibras e o aumento da massa muscular caracterizam a maturação do músculo (Maltin et al., 2001). Distintos tipos de fibras musculares constituem os músculos esqueléticos dos mamíferos adultos (Punkt et al., 2004).

O músculo esquelético é essencialmente caracterizado pelas isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC - miosyn heavy chain) específicas que são proteínas miofibrilares (Pette e Staron, 2000). Diferentes isoformas MHC são expressas durante o desenvolvimento das fibras musculares (Pette e Staron, 2000). Dentre as isoformas MHC encontradas nos músculos esqueléticos estão: duas isoformas de desenvolvimento (embrionária e fetal/perinatal/neonatal), uma isoforma lenta (MHC I/β) e três isoformas rápidas: MHC IIa, MHC IIx (MHCIId) e MHC IIb (Staron et al., 1993; Pette e Staron, 2000). A expressão singular de cada uma destas isoformas na fibra resulta no aparecimento dos diferentes tipos de fibras (Talmadge, 2000). Assim, as fibras

tipo I, compostas por MHC I, são resistentes à fadiga e caracterizadas por uma reduzida velocidade de encurtamento (Talmadge, 2000; Caiozzo et al., 1996). As fibras rápidas tipo IIa, constituídas por MHC IIa que tem uma velocidade de contração rápida e são pouco fatigáveis (Billeter et al., 1981 ; Punkt et al., 2004 ; Talmadge, 2000; Caiozzo et al., 1996 ;Vescovo et al., 2001) e as fibras tipo IIb, constituídas por MHC IIb, possuem contração rápida e são fatigáveis (Billeter et al., 1981 ; Punkt et al., 2004 ; Talmadge, 2000; Caiozzo et al., 1996 ;Vescovo et al., 2001). As fibras tipo IIx são constituídas por isoformas MHC IIx, apresentam contração rápida, mas elas não conseguem sustentar esta contração por muito tempo (Caiozzo et al., 1996 ; Talmadge, 2000;Vescovo et al., 2001). Uma grande porcentagem de fibras musculares expressa mais de uma isoforma de MHC (Caiozzo et al., 1996 ; Talmadge, 2000;Vescovo et al., 2001). Estas fibras são denominadas fibras intermediárias, ou híbridas (Caiozzo et al., 1996 ; Talmadge, 2000;Vescovo et al., 2001). As fibras híbridas representam estágios intermediários de um processo de transição, que pode ser estimulado pelo treinamento ou detreinamento, ou pelo envelhecimento (Caiozzo et al., 1996; Talmadge, 2000;Vescovo et al., 2001).

Durante o desenvolvimento muscular em ratos, as primeiras fibras primárias expressam MHC embrionária e lenta, mas em seguida, em algumas destas fibras, esta expressão é perdida e a MHC neonatal é expressa (Condon et al., 1990; Lefaucheur et al., 1995). No 18º dia embrionário, a maioria das fibras primárias expressa a miosina neonatal (Condon et al., 1990). As fibras secundárias expressam MHC embrionária e neonatal, embora algumas delas mudem posteriormente para MHC lenta (Condon et al., 1990; Lefaucheur et al., 1995).

Após o nascimento, em roedores, as isoformas de desenvolvimento embrionária e, principalmente, a neonatal são predominantes nos músculos esqueléticos (Agbulut et al., 2003). Em ratos, a manifestação da MHC tipo I (lenta) durante o desenvolvimento dos músculos lentos,

ex. o solear do rato, parecem coincidir com a diminuição na expressão da isoforma embrionária (Adams et al., 1999). Enquanto que nos músculos rápidos, por exemplo, o extensor longo dos dedos (EDL), a transformação para o padrão fenotípico adulto das MHC parece envolver mudanças entre as isoformas neonatal e rápida (Adams et al., 1999). A conversão das isoformas neonatal para MHC rápida adulta foi observado na primeira semana pós-natal no músculo gastrocnêmio de ratos (Butler-Browne et al., 1982).

Em ratos, no período pós-natal, os músculos rápidos e lentos apresentam proporções aproximadamente semelhantes de fibras rápidas e lentas antes de se iniciar a diferenciação (Ishihara e Taguchi, 1991). Na primeira semana pós-natal, aproximadamente 50% das fibras do solear, por exemplo, são rápidas, enquanto entre o primeiro e segundo mês de vida esse percentual cai para aproximadamente 10% (Wigston e English, 1992). A proporção de fibras tipo I aumentou do 8º ao 75º dia pós-natal no solear, enquanto o EDL essa proporção de fibras tipo I diminuiu do 8º ao 21º dia pós-natal (Punkt et al., 2004). Os subtipos de fibras rápidas foram visíveis somente nos estagios tardios e as fibras IIa e IIb foram vistas aos 21 dias de vida pós-natal (Punkt et al., 2004).

Uma importante característica do músculo esquelético é sua plasticidade (Harrison et al., 1996). O padrão fenotípico de fibras musculares durante o desenvolvimento é dependente de fatores neurais e humorais (Pette e Vrbova, 1985; Grambke et al., 1983), além disso, a atividade contrátil muscular também influencia a tipologia muscular (Baldwin e Haddad, 2001). Durante o desenvolvimento, os músculos se adaptam para realizar funções especializadas e distintas (Agbulut et al., 2003). Isto é refletido na composição e no nível de expressão das isoformas MHC dentro do músculo (Agbulut et al., 2003). A proporção das isoformas dos músculos durante o crescimento e desenvolvimento está relacionada à maturação funcional destes músculos (Gojo et al., 2002).

Segundo o padrão funcional, os músculos esqueléticos apresentam um perfil de tipos de fibras bem definido ao desmame, em ratos (Punkt et al., 2004). Nesse período, os filhotes abandonam o ninho, e estão prontos para exercer com independência suas funções motoras na locomoção e habilidades comportamentais diversas (Punkt et al., 2004).

Na maioria dos vertebrados, seja numa fase precoce do período pós-natal, ou na idade adulta, a hipertrofia muscular, está sob o controle do estresse mecânico (Kadi e Thornell, 2000). Um músculo hipoativo ou treinado esta sujeito a mudanças na força máxima, na distribuição entre os distintos tipos de fibras constituintes, assim como em suas propriedades mecânicas contráteis e elásticas (Goubel e Marini, 1987; Almeida-Silveira et al., 1994; Canon e Goubel, 1995; Canon et al., 1998).

1.1.3. Desenvolvimento da Atividade Locomotora

A locomoção é essencial para a sobrevivência dos mamíferos e é controlada de forma fina e precisa ao sistema nervoso (Purves, 1994; Burns e MacDonald, 1999; Massion, 1998). As habilidades motoras funcionais vão se aperfeiçoando à medida que se consolida o processo de desenvolvimento do sistema locomotor, juntamente com as mudanças complexas e interligadas que acompanham o crescimento e maturação dos sistemas orgânicos (Purves, 1994; Burns e MacDonald, 1999; Massion, 1998). O desenvolvimento físico influencia o desenvolvimento perceptual e viso-motor (Purves, 1994; Burns e MacDonald, 1999; Massion, 1998). O desenvolvimento sensório-motor depende do meio, da estimulação recebida desde o nascimento

(Purves, 1994; Burns e MacDonald, 1999; Massion, 1998). As ocorrências de transtornos, limitações à livre movimentação ou restrições nutricionais alteram o processo de desenvolvimento. No diagnóstico dos déficits relacionados a mudanças do desenvolvimento neuromuscular e psicomotor no início da vida, o exame da ontogênese motora é sem dúvidas uma ferramenta importante (Eikman et al., 2002).

Tema de pesquisas e de proposições teóricas é a natureza e a função dos reflexos (Fox, 1965; Zernicke e Scheneider, 1993). Há algum tempo atrás se acreditava que os reflexos neonatais eram inibidos para que o comportamento maduro pudesse se estabelecer (Zernicke e Scheneider, 1993). Atualmente, a proposição mais aceita é de que esses comportamentos precoces são pré-funcionais (Zernicke e Scheneider, 1993). Assim, à medida que o ser em desenvolvimento se locomove, entra em contato com seu ambiente; o reflexo primitivo, que seria a forma imatura da ação motora, expressão do padrão congênito, se aperfeiçoaria em direção ao comportamento motor adequado à tarefa e situação (Zernicke e Scheneider, 1993).

Em cada espécie, os eventos relacionados ao desenvolvimento motor seguem uma seqüência característica e pré-determinada (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Gramsbergen, 1998). Em murinos, há uma seqüência ontogenética para o desenvolvimento motor (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Gramsbergen, 1998). Constata-se período inicial de movimentação reflexa, cujas atividades permitem a conservação da temperatura corporal e a posterior aquisição de um controle voluntário (Fox, 1965). Exames ultra-sonográficos em humanos revelaram no feto a presença de padrões motores semelhantes aos descritos no recém-nascido (Hertz et al., 1979; De Vries et al., 1982). Por volta da 18ª semana de gestação, o feto começa a empurrar os pés contra a parede uterina. Esta propulsão, às vezes referida como saltos, permite que o feto modifique sua posição, ajudando-o mais tarde a colaborar durante o parto (Hertz et al., 1979; De Vries et al., 1982). Durante o sétimo mês de gestação foram observados movimentos recíprocos

dos membros, chamados “de locomoção”, em vista de sua semelhança com a marcha (Hertz et al., 1979; De Vries et al., 1982). Esses dados confirmam a opinião que o substrato neurológico para a produção de diversos comportamentos motores está disponível em época muito precoce do desenvolvimento, que ele está presente ao nascimento e que os primeiros movimentos são pré-funcionais, no sentido de se modificarem para dar lugar aos atos motores maduros (Hertz et al., 1979; De Vries et al., 1982). No fim da segunda semana de vida pós-natal, os padrões de movimento e locomoção tornam-se mais similares àqueles do adulto (Fox, 1965). Esta semelhança dos movimentos àqueles do adulto é nítida ao desmame (Walton et al. 1992). Esses padrões de movimento e locomoção, porém, ainda se desenvolvem nas fases de crescimento e maturação sexual, com grande refinamento da coordenação (Walton et al. 1992).

1.2. DESNUTRIÇÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS SOBRE O SISTEMA LOCOMOTOR

1.2.1. Programação

Estudos epidemiológicos e em animais demonstram que estímulo ambiental durante período crítico do desenvolvimento causa efeito em longo prazo e repercute na idade adulta (Hales e Barker, 1992; Toscano et al., 2008a e b). A desnutrição no período fetal ou neonatal predispõe o indivíduo adulto a doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, ou aos fatores de risco

associados como a hipertensão, intolerância à glicose e hiperlipidemia (Forsdahl e Waaler, 1976; Hales e Barker, 1991; Barker e Osmond, 1986; Barker et al., 1989). A hipótese da influência fenotípica (Thrifty phenotype hypothesis) surgiu com base nessas observações. Segundo Hales e Barker, 1992, o organismo se adaptaria a um ambiente intra-uterino escasso e adverso, e em consequência aproveitaria ao máximo a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência. Contudo, após o período crítico, havendo aumento na disponibilidade de nutrientes, as alterações metabólicas do organismo poderiam predispor à obesidade e a diabetes tipo II (Hales e Barker, 1992).

O mecanismo é ainda pouco claro, todavia parece se associar a uma “programação” na vida fetal ou pós-natal, onde alterações ambientais acontecidas nestes períodos críticos de desenvolvimento têm subsequente impacto molecular, estrutural, funcional sobre os sistemas fisiológicos (Lucas, 1991). De qualquer forma, parece que o organismo disponibiliza processos adaptativos de forma a resistir às agressões (Hales e Barker, 1992). Estas sinalizações exógenas ou endógenas no início da vida em organismo em desenvolvimento disparam mecanismos de programação que podem ecoar adversamente na vida adulta (Lucas, 1991).

Os seres vivos que preservam a sua plasticidade durante o desenvolvimento, de modo geral, parecem ser mais aptos às alterações ambientais (Hales e Barker, 1992). Por outro lado, em consequência dessas alterações, um organismo que tem precocemente no desenvolvimento fixo seu fenótipo sofre maiores danos (Bogin, 1999). Desta forma, a seleção natural não favorece organismos inaptos que, no início do desenvolvimento, reduzem a habilidade em adaptarem-se às alterações ambientais subsequentes (Wells, 2007). As estratégias adaptativas que compreendem a programação estão relacionadas tanto pela relação mãe-filhote como pela

carga genética (Wells, 2007). Uma questão de interesse é o conhecimento de como a memória destes eventos é armazenada ao longo da vida apesar de uma contínua divisão e diferenciação celulares (Wells, 2007). O mecanismo proposto inclui efeitos adaptativos sobre a expressão de genes transmitidos para a progênie de células originalmente programadas (Lucas et al., 1999). O ambiente nutricional prévio pode estimular uma seleção clonal adaptativa ou proliferação e diferenciação celular de forma que a quantidade e proporção de células em um tecido são permanentemente afetadas (Lucas, 1998).

A influência do ambiente na expressão do código genético corresponde à noção de epigenética (Young, 2001). Muitos genes requerem condições especiais do ambiente para ganharem expressão fisiológica e comportamental, outros genes provavelmente nunca encontrarão condições adequadas de expressão (Young, 2001). Existem evidências de que o estado nutricional materno pode induzir alterações da expressão de genes através da metilação do DNA e da modificação de histonas (metilação e acetilação) do genoma fetal (Smith et al., 2006). Este fato pode fornecer o mecanismo molecular para o impacto da nutrição materna sobre a programação fetal e o “imprinting” genômico (Smith et al., 2006).

Os “imprinted” genes são aqueles encontrados na placenta de mamíferos, marsupiais e semente de plantas cuja expressão depende de sua origem parental (Young, 2001). Em mamíferos, muitos destes genes estão envolvidos no crescimento fetal e são expressos tanto em tecidos do feto como na placenta (Young, 2001). O papel dos “imprinted” genes no feto e na placenta de camundongos pode ser geneticamente distinto. Na placenta esses genes regulam o crescimento e a transferência específica de nutrientes (Constancia et al., 2002; Angioloni et al., 2006).

A nutrição deficiente da fêmea antes da implantação no útero do ovo pode retardar o crescimento e desenvolvimento do embrião que é também particularmente sensível às agressões no início da gestação (McCrabb et al., 1991). Já no meio da gestação, a placenta cresce mais rapidamente que o feto; portanto, a desnutrição pode interferir no crescimento fetal através de mudanças na interação feto-placentária (McCrabb et al., 1991). A nutrição deficiente na gestação leva ao retardo imediato no crescimento fetal, retarda a velocidade de crescimento fetal de modo irreversível com diminuição do comprimento e do peso ao nascer (Mellor e Murray, 1982; Barker, 2001). Dessa forma, a integridade da função placentária do feto desnutrido parece ser mantida, à custa da redução da velocidade do seu próprio crescimento (Barker, 2001). Assim, a desnutrição fetal nas diferentes fases da gestação pode produzir neonatos com distintas dimensões corporais totais ou mesmo similares, mas com diferenças acentuadas na proporção dos diversos órgãos (Barker, 2001). A desnutrição materna durante a gestação diminui o número de células na massa celular do feto, o que está associado à redução do peso ao nascer e do crescimento pós-natal e com as alterações nas proporções dos pesos dos órgãos em relação ao peso corporal (Kwong et al., 2000).

O organismo desnutrido pode alterar seletivamente a velocidade relativa de crescimento dos diferentes órgãos, de acordo com prioridades que podem variar com o sexo (Ozanne e Hales, 1999). Ajustes metabólicos de vários tecidos, a fim de que a prole possa ser programada, para sobreviver à condição pós-natal de nutrição precária, podem ocorrer no tecido adiposo, no fígado, e no músculo (Ozanne e Hales, 1999).

O estado nutricional durante período crítico de desenvolvimento é um indutor da programação e é importante foco de estudos (Hales e Barker, 1992). Um modelo de estudo, é o de manipulação do percentual da dieta fornecida ao rato que se quer submeter à desnutrição, geralmente restringindo a 30 a 50% daquela do consumo normal do controle de acordo (Woodall

et al., 1996; Bayol et al., 2004). Houve atraso no crescimento pós-natal e aumento na pressão arterial na idade adulta conseqüente à restrição da dieta (30% da dieta consumida pelo controle ad libitum) durante a gestação e após recuperação na lactação em ratos (Woodall et al., 1996). Filhotes nascidos de mães alimentadas com 40% da dieta ad libitum fornecida ao grupo controle apresentaram menor taxa de crescimento quando comparados ao grupo controle (Bayol et al., 2004).

Outro modelo animal de estudo bem estabelecido é a submissão de mães à dieta normoprotéica (com 18-20% de proteína, caseína) ou à dieta hipoprotéica (7% a 8% de proteína, caseína), e em seguida no período de lactação ou no desmame, fornecer aos seus filhotes dieta padronizada (Bennis-Taled et al., 1999; Snoeck et al., 1990). Fetos de mães submetidas à dieta hipoprotéica apresentam alterações metabólicas em longo-prazo (Bennis-Taled et al., 1999; Berney et al., 1997; Passos et al., 2000; Lesage et al., 2002; Ozanne e Hales, 1999). Em ratos machos, a restrição de proteína na dieta altera o desenvolvimento reprodutivo aos 70 dias de idade (Zambrano et al., 2005). Déficit estrutural no rim, inclusive com redução da pressão arterial média, foi observado em ratos adultos (135 dias de idade), submetidos à dieta hipoprotéica (8% de caseína) durante o período pré e pós-natal, quando comparados aos seus pares normoprotéicos (20% de caseína) (Hoppe et al., 2007). Portanto, não somente restrição da quantidade total de dieta, mas também do tipo de nutriente, particularmente a restrição de proteínas, durante o período crítico do desenvolvimento, podem induzir alterações na taxa de crescimento do filhote.

Há recentes investigações sobre o efeito da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento muscular (Ozanne et al., 1996; Ozanne et al., 2003). O músculo, principal local de consumo de glicose pós-prandial, tem também sido alvo de estudos (Ozanne et al., 1996; Ozanne e Hales, 1999). O músculo solear de ratos aos 15 meses de idade e que foram submetidos à desnutrição fetal apresentam menor sensibilidade à insulina quando comparado ao controle normoprotéico

(Ozanne et al., 2003). Por outro lado, Sampaio e colaboradores (2003) e Ozanne e colaboradores (1996) referem que a desnutrição durante a gestação ou durante o período pós-natal precoce aumenta a sensibilidade a insulina no músculo esquelético de ratos adultos. Este aumento parece estar relacionado à expressão elevada de receptores de insulina no músculo (Ozanne et al., 1996; Ozanne et al., 2003).

A desnutrição poderia produzir alterações no sistema neuro-músculo-esquelético, que permitiriam ao organismo maior chance de sobrevivência durante a agressão, mas poderiam limitar sua capacidade funcional (Hales e Barker, 1992; Morgane et al., 1993; Ozanne et al., 1996; Ozanne et al., 2003). Entretanto, são escassas as informações sobre agressões no período precoce da vida sobre o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema locomotor. Diante disso, levando-se em consideração a vulnerabilidade a agressões neste período devido à velocidade dos eventos celulares, deve ser igualmente considerado o risco de modificações sobre o desenvolvimento estrutural em sistemas orgânicos e em funções a eles relacionadas, a exemplo das funções neuromusculares.

1.2.2. Desnutrição e Sistema Nervoso relacionado à motricidade

A nutrição perinatal pode influenciar de alguma maneira o processo de maturação neural (Morgane et al., 2002; Chang et al., 2003; Hernandez e Almeida, 2003). Todos os nutrientes são fatores essenciais para consolidação do desenvolvimento orgânico, sendo a desnutrição um sério risco para organização morfológica e funcional das estruturas do sistema nervoso (Tonkiss et al., 2003; Perez-Torrero et al., 2003). Contudo, a proteína parece ser o componente mais crítico para o desenvolvimento de funções nervosas (Morgane et al., 2002; Chang et al., 2003; Hernandez e Almeida, 2003).

A desnutrição produz efeitos, nos processos organizacionais precoces de neurogênese, migração celular e diferenciação, ainda dentro do útero, como também fora dele; ou seja, nos denominados períodos críticos de desenvolvimento (Morgane et al., 1993). Em relação às etapas de desenvolvimento nervoso, as agressões nutricionais a depender do tipo, da severidade, da duração e do período de ocorrência, poderão ocasionar alterações irreversíveis mesmo após recuperação nutricional (Morgane et al., 1993).

A desnutrição provoca alterações estruturais dos neurônios tanto em animais experimentais quanto em humanos, tais como: redução do número (Rosso et al., 1970; Bedi, 2003) e da forma (Resnick et al., 1979; Borba et al., 2000). Assim, foram observadas mudanças na composição celular do cérebro, afetando as proporções dos diferentes tipos neuronais e também gliais (Morgane et al., 1993). Verifica-se diminuição no tamanho e peso cerebral após desnutrição precoce (Leuba e Rabinowicz, 1979; Marin et al., 1995; Kehoe et al., 2001). Igualmente, há alterações no desnutrido de eventos regressivos normais que prejudicam a

formação dos circuitos neuronais inerentes à organização cerebral, tais como: a morte celular programada e a perda dos dendritos, além de atraso do processo de mielinização (Noback e Eisenman, 1981).

As alterações do SN no desnutrido têm nítidas conseqüências fisiológicas e comportamentais (Smart e Dobbing, 1971; Lynch et al., 1975; Morgane et al., 1993). No estudo da depressão alastrante, um indicador de funcionamento e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, foi verificado que a desnutrição no início da vida facilita a propagação desse fenômeno nervoso (Rocha-de-Melo e Guedes, 1997). Ocorre também retardo na ontogenia dos reflexos em ratos, pior desempenho em testes de coordenação e atraso no desenvolvimento da locomoção, tudo isto acompanhado de atraso no aparecimento de importantes características físicas (Smart e Dobbing, 1971; Lynch et al., 1975; Gramsbergen e Westerga, 1992; Barros et al., 2006). Indivíduos submetidos à desnutrição neonatal apresentam alterações da agressividade que parecem estar relacionadas ao baixo limiar para o “stress” (Levitsky e Barnes, 1972). As respostas emocionais do durante a desnutrição estão exacerbadas em condições estressantes (Levitsky e Barnes, 1970; 1972; Sobotka et al., 1974). Os processos de atenção perturbados no desnutrido dificultam as interações do organismo com o ambiente, induzindo freqüentemente aos problemas de aprendizagem (Morgane et al., 1993).

Assim, a desnutrição gestacional pode acarretar comprometimento no crescimento e desenvolvimento do SNC dos descendentes (Ivanovic, 2000; Bhatia, 1991). Se essas modificações do SN provocadas pela desnutrição perinatal afetam o desempenho motor, de forma independente, ou estão associadas a danos também no sistema muscular, interferindo na capacidade do indivíduo interagir com seu meio é uma boa questão científica. Ademais, é

relevante saber se as eventuais seqüelas da desnutrição sobre o sistema locomotor persistem após recuperação nutricional.

1.2.3. Desnutrição e Sistema Muscular

O sistema muscular apresenta períodos do desenvolvimento particularmente vulneráveis aos insultos nutricionais (Bedi et al., 1982). Neste período, a desnutrição pode danificar irreversivelmente a estrutura muscular (Bedi et al., 1982). A desnutrição durante a gestação pode reduzir a multiplicação celular; por conseguinte, diminuindo o número das fibras e dos núcleos musculares na prole (Bedi et al., 1982, Park et al., 2003; Bayol et al., 2004).

Em animais há um período crítico durante a gestação cuja incidência da desnutrição materna altera a formação da fibra muscular na prole (Dwyer et al., 1995). Para a formação dos miotubos secundários, durante a ontogênese do músculo esquelético, o período gestacional é crítico (Wilson et al., 1988). A desnutrição intra-uterina parece reduzir o número da subpopulação de células miogênicas, limitando permanentemente o número de miotubos secundários (Wilson et al., 1988).

A desnutrição em períodos precoces da vida, particularmente no período fetal, pode induzir alterações metabólicas, estruturais e funcionais no músculo esquelético; dentre essas, observam-se: diminuição do peso muscular (Bedi et al., 1982; Toscano et al., 2006), modificações estruturais nos sarcômeros (Oumi et al., 2000), e aumento na capacidade oxidativa muscular (White et al., 2000). Há também redução na densidade de fibras no diafragma em ratos

(Prakash et al., 1993) assim como alterações no metabolismo protéico nas miofibrilas, ocasionando perda de massa muscular (Fiorotto et al., 2000). Vários trabalhos referem modificações nas características histológicas dos músculos de animais desnutridos durante o período crítico de desenvolvimento (Bedi et al., 1982 ; Lefaucher et al., 2003 ; White et al., 2000 ; Zhu et al., 2006). Entretanto, o conjunto desses trabalhos mostra uma heterogeneidade nos resultados referidos (Bedi et al., 1982 ; Lefaucher et al., 2003 ; Zhu et al., 2006). A desnutrição durante a gestação e aleitamento não modifica as proporções dos diferentes tipos de fibras no músculo solear, porém aumenta as fibras tipo I e tipo IIa e diminui as fibras tipo IIb no músculo EDL de rato aos 180 dias de vida (Bedi et al., 1982). A desnutrição durante a primeira semana de vida pós-natal aumenta as fibras tipo I e retarda a diminuição das fibras tipo IIa no músculo longuíssimo dorsal de porcos (Lefaucher et al., 2003). A desnutrição durante a gestação, no entanto, aumenta as fibras tipo IIb e diminui as fibras tipo IIa no músculo longuíssimo dorsal de ovelhas (Zhu et al., 2006).

Do ponto de vista das propriedades contráteis, nas fibras do músculo diafragma, Prakash e colaboradores (1993) referem uma diminuição da força relativa desenvolvida no rato desnutrido durante a gestação, enquanto que Brozanski e colaboradores (1993) não encontram nenhuma modificação nos ratos desnutridos durante a gestação e o aleitamento. No entanto, Wareham e colaboradores (1982) encontraram um aumento na força tetânica relativa desenvolvida pelo solear e pelo extensor longo dos dedos de ratos aos 12 meses, desnutridos durante o período fetal e de aleitamento.

1.2.4. Desnutrição e atividade locomotora

A alimentação materna deficiente não atinge apenas o crescimento do concepto, mas também afeta altera um conjunto de comportamentos interativos materno-infantis, acarretando déficit na conduta exploratória do filhote (Massaro et al., 1974, Riul et al., 1999). A desnutrição neonatal está associada a uma variedade de déficits cognitivos e comportamentais através da vida (Wachs, 1995). A desnutrição promove retardo em comportamentos indicativos de desenvolvimento em ratos, como o de dispersão da ninhada (Massaro et al., 1974).

A redução da atividade locomotora comumente se associa à diminuição da interação social (Salas et al. 1998), ou a alterações no comportamento emocional em ratos neonatos (Smart e Dobbing, 1971). Smart e Dobbing (1971) observaram aumento de movimentos de rotação em ratos neonatos desnutridos que parecia dificultar o padrão de desenvolvimento do movimento organizado. Nagy e colaboradores (1977) obtiveram resultados similares, e interpretaram a “agitação comportamental” como sendo uma falta de inibição do comportamento locomotor. Redução do crescimento cerebelar seguidas de mudanças no padrão de movimentação são observadas em ratos desnutridos (Lynch et al. 1975).

Os atrasos no desenvolvimento psíquico e motor em humanos podem estar associados à desnutrição precoce. Estudos indicam que baixos escores escolares se correlacionam respectivamente a sinais de desnutrição pregressa e redução na coordenação motora (Ivanovic et al, 1996; Benefice, 1999). São evidentes os efeitos deletérios da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento infantil em humano (Benítez-Bribiesca et al., 1999; Grantham-McGregor et al.,

1987; Drewett et al. 2001), em particular na evolução de comportamentos motores (Bhatia et al. 1979; Benefice et al., 1999).

Um ambiente adverso prenatal pode induzir ao desenvolvimento anormal do comportamento alimentar e do desempenho para exercício (Vickers et al., 2003). É de grande importância compreender como a locomoção poderá ser afetada diante de uma agressão nutricional num período crítico para o desenvolvimento de sistemas envolvidos no desenvolvimento motor.

1.3. ESTUDO DAS CARACTERISTICAS DO SISTEMA LOCOMOTOR

1.3.1. Estudo das propriedades mecânicas musculares

As diferentes propriedades mecânicas distinguem-se entre si, estando o músculo esquelético no estado ativo ou passivo (Close, 1972). Diante da sua complexidade, a análise das propriedades mecânicas do músculo esquelético foi viabilizada através do desenvolvimento de uma seqüência histórica de modelos teóricos. Assim, em 1927, Levin e Wyman realizaram uma tentativa de modelização do comportamento mecânico do músculo esquelético. Em 1935, Fenn e Marsh estabeleceram uma relação entre a força e a velocidade não linear a partir do encurtamento em condições isotônicas e isocinética. Uma nova representação do músculo foi proposta por Hill

em 1938. Esse serviria tanto para músculos isolados quanto para músculos *in situ*. Segundo esse modelo os músculos seriam constituídos por dois componentes: um componente elástico em série (CES) e um componente contrátil (CC) (Hill, 1938). Esse modelo, entretanto não levava em conta a rigidez passiva do músculo ao estiramento. Precisando intervir um terceiro componente responsável pela tensão de repouso: o componente elástico em paralelo (CEP) (Hill, 1951).

Posteriormente com contribuição do modelo molecular desenvolvido por Huxley e Simmons (1971) com organização do CES em duas frações (passiva e ativa) permitiu a proposição de modelo de três componentes modificado (Figura 2) (Shorten, 1987).

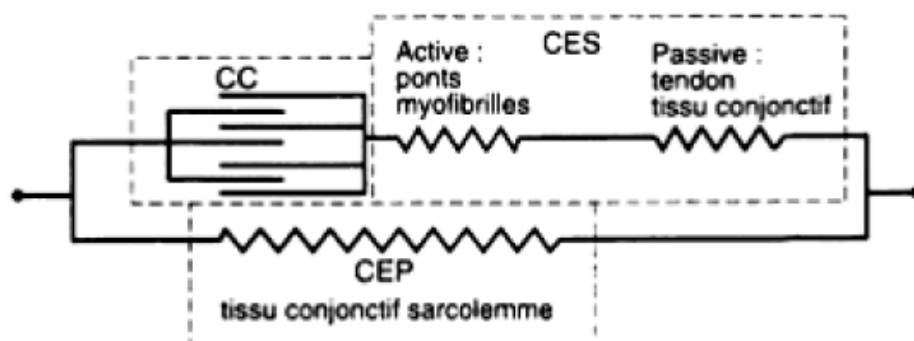


Figura 2: Modelo muscular dos três componentes (segundo Shorten, 1987).

O modelo dos três componentes é constituído por um componente contrátil (CC), um componente elástico em série (CES) e um componente elástico em paralelo (CEP):

Componente Contrátil (CC)

Representa o gerador de força (Shorten, 1987). Está localizado nos sarcômeros e corresponde anatomicamente as pontes de actina-miosina (Shorten, 1987). É o conversor de energia química em energia mecânica (Shorten, 1987). A força gerada por esse componente depende do comprimento e da velocidade em que a contração é efetuada (Shorten, 1987).

Para a análise do componente contrátil, a tensão tetânica máxima (P_0) desenvolvida pelo músculo em condições isométricas, é o parâmetro mais comumente utilizado (Canon e Goubel, 1995). O segundo parâmetro utilizado é a força máxima desenvolvida durante o abalo muscular (P_t) (Canon e Goubel, 1995).

Em condições estáticas, a relação força-comprimento característica do componente contrátil é obtida sobre o músculo isolado e tetanizado, medindo-se a força isométrica (P_0) desenvolvida em diferentes comprimentos (Albert et al., 1951). Essa força é máxima para comprimentos do músculo próximo ao comprimento de repouso (L_0) (Albert et al., 1951). Essa observação permite a determinação do comprimento ótimo (L_0) para geração da força (Albert et al., 1951).

Em condições dinâmicas, o encurtamento do músculo em função da carga se traduz pela relação Força-Velocidade descrita por Hill (1938). A força é máxima quando a velocidade é nula (P_0) e que a força é nula quando a velocidade é máxima (Hill, 1938). Quando um músculo é tetanizado ao máximo e desenvolve uma força P_0 em condições isométricas, se lhe é imposta uma redução no seu comprimento durante a contração (em condições isotônicas), em uma dada velocidade V , ele passa a desenvolver uma força inferior, denominada P (Hill, 1938; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003). A Velocidade Máxima de Encurtamento do músculo (V_{max}) pode ser avaliada através de experimentação utilizando a técnica do músculo isolado e estimulado em

contração tetânica, que é submetido a encurtamentos a diferentes velocidades, sob carga constante (Hill, 1938; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003). A força constante apresentada durante o estado de ativação sofre variações de acordo com a velocidade do encurtamento, sendo mensurada e ajustada matematicamente numa curva tipo hiperbólica, através da Equação de Hill (Hill, 1938; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003). Aplicando velocidades variadas e determinando os valores P e V obtidos em diversos pontos, pode-se obter a V_{max} sob carga nula (Hill, 1938; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003). A linearização da curva pode ser obtida igualmente, para determinação da V_{max} (Hill, 1938; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003).

A velocidade de encurtamento de um músculo pode ser bem diferente seja ele um músculo lento ou rápido. O EDL, músculo rápido, pode ter uma V_{max} 2,2 vezes maior que o solear (Close, 1972). A V_{max} é função da miosina ATPase e correlações entre V_{max} e a percentagem de MHC rápidas têm sido mostradas (Reiser et al., 1985). Além da tipologia muscular, a arquitetura muscular também pode influenciar a V_{max} (Vandewalle, 1992). Ou seja, em músculos com maior ângulo de penetração (ângulo formado entre a direção das fibras musculares e a direção da tração muscular) apresentam velocidades mais baixas em relação aos músculos que possuem arranjo de fibras em paralelo, se levada em consideração a velocidade num sarcômero idêntico nos dois tipos (Woittiez et al., 1987). No entanto, é digno de nota que sendo a força isométrica máxima maior num músculo penado, isto aumenta igualmente a sua possibilidade de se encurtar, o que influencia a sua V_{max} . (Vandewalle, 1992). Ademais, a velocidade de encurtamento é resultante não apenas da soma das velocidades das fibras, mas também da participação das aponeuroses (Zuurbier e Huijing, 1992). Em condições de desuso ou excesso de uso, também foram relatadas mudanças na V_{max} em ratos adultos (Eken e Gundersen, 1988; Almeida-Silveira et al., 1994; Canon e Goubel, 1995).

Outros parâmetros também caracterizam o CC: a força e a cinética da contração. A força pode inicialmente ser avaliada a partir de um abalo muscular simples, que é normalmente produzido em reação a um único potencial de ação do neurônio motor (Canon e Goubel, 1995). Em preparação de músculo isolado, o abalo muscular pode ser obtido em resposta a um estímulo elétrico (Canon e Goubel, 1995). Os parâmetros que caracterizam o abalo simples são o tempo decorrido até chegar ao pico da contração (CT), a tensão produzida durante o pico de CT (P_t = força máxima durante o abalo muscular), e o tempo necessário para se atingir 50% do relaxamento após o pico de contração (HRT) (Canon e Goubel, 1995).

O CT e HRT estão estreitamente relacionados à cinética de liberação e remoção de íons cálcio das miofibrilas durante a contração muscular (McDonald et al, 1994). Esses processos exercerão uma influência sobre a relação entre o complexo troponina – tropomiosina e a actina, modificando-a e produzindo a contração e posteriormente o estado de relaxamento (McDonald et al, 1994). Além disso, caso o Componente Elástico em Série de um mesmo tipo de músculo lento ou rápido se torne mais complacente, pode haver um aumento na cinética do abalo muscular (Almeida-Silveira et al., 1994).

Ainda, no estudo do CC, existe o Teste de Fadiga Muscular. A Fadiga Muscular, de modo resumido pode ser definida como declínio da tensão muscular com a estimulação repetitiva e prolongada durante uma atividade muscular (Burke et al., 1973). O protocolo mais utilizado para o teste de Fadiga Muscular foi o de Burke e colaboradores (1973), que emprega trens de pulso de estimulação, repetidos continuamente todos os segundos, durante dois minutos. Determina-se o Índice de Resistência à Fadiga utilizando-se a comparação entre a amplitude das forças produzidas no decorrer do teste com aquela obtida na primeira estimulação (Burke et al., 1973).

Componente Elástico Em Série (CES)

Este componente é responsável pela ligação entre o componente contrátil e a periferia (Shorten, 1987). Tem o papel de transmitir as diferentes tensões desenvolvidas pelo CC (Shorten, 1987). Segundo suas características, esse componente é capaz de estocar mais ou menos energia potencial que ele pode restituir, uma parte, a partir de seu encurtamento ou liberar sob a forma de calor (Cavagna, 1977). Esse componente é dividido numa parte ativa, localizada nas pontes de actina-miosina e numa parte passiva, localizada dentro das estruturas tendinosas e do endomísio (Shorten, 1987). É caracterizado por uma curva tensão-extensão obtida quando o músculo é mantido em condições isométricas máximas (Canon e Goubel, 1995). Esta curva é obtida diminuindo o comprimento do músculo de forma rápida, mantendo este em condição de contração máxima (Canon e Goubel, 1995). A diminuição da força é então atribuída aos elementos elásticos em série (Canon e Goubel, 1995). Esta curva permite determinar os parâmetros de rigidez do CES (Goubel e Lenseel-Corbeil, 2003).

As modificações nos parâmetros de rigidez da CES podem ser, em parte, devido às transformações nas isoformas de miosina (Canon et al., 1995). Vários trabalhos reforçam a ideia de que fibras do tipo lenta apresentam maior rigidez do CES em relação às fibras do tipo rápida (Goubel e Marini, 1987; Pousson et al., 1991; Canon et al., 1995). Além das modificações mecânicas na parte ativa do CES (pontes de actina-miosina), as modificações em nível da estrutura passiva (tendões) desse componente também podem influenciar os parâmetros de rigidez da CES (Almeida-Silveira et al., 1994; Canon et al., 1995).

Componente Elástico em Paralelo (CEP)

Esse componente é anatomicamente representado pelos sarcolemas, envoltórios conjuntivos das fâscias, pontes residuais de actina-miosina e de ligação e proteínas de conexão, (como a titina e nebulina) (Shorten, 1987). Graças a sua localização, esse componente não está sob tensão pelas forças contráteis, é a CEP que desempenha um papel preponderante sobre a resistência que o músculo oferece ao estiramento passivo (Anderson et al., 2002).

O CEP é, assim, caracterizado pela relação tensão-extensão ou contração-deformação (Anderson et al., 2002). Esta relação pode ser obtida pelo registro da tensão desenvolvida por um músculo inativo (condição passiva), quando submetido a diferentes comprimentos (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2002). A tensão passiva desenvolvida é resultado não apenas do estiramento que é imposto, mas também da velocidade com que é induzido (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2002). Na análise do CEP é possível determinar parâmetros de rigidez do CEP e eventualmente de viscosidade (Anderson et al., 2001; Anderson et al., 2002).

A complacência dos músculos esta relacionada ao conteúdo de colágeno presente na sua composição (Kovanen et al., 1984). Além do colágeno, outras estruturas estão envolvidas na elasticidade passiva. A elasticidade também resulta de uma associação entre a matrix exosarcomérica e endosarcomérica (Wang et al., 1991; Wang et al., 1993; Kiss et al., 2006). A matrix exosarcomérica concerne à rede de filamentos intermediários que envolvem e interconectam os sarcômeros, como a desmina (Kiss et al., 2006) (Figura 3). A matrix endosarcomérica compreende por sua vez dos filamentos extensíveis como a titina fixada em nível da linha Z (Wang et al., 1991; Wang et al., 1993).

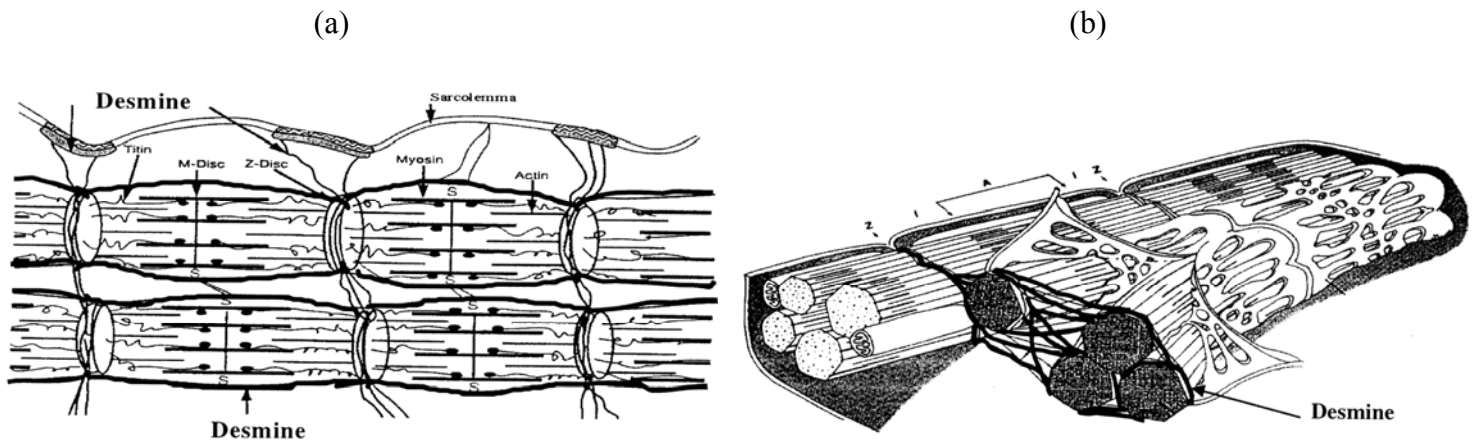


Figura 3: (a) Corte longitudinal dos filamentos intermediários ligando as bandas Z dos sarcômeros adjacentes (segundo, Price, 1991). (b) Localização transversal dos filamentos de desmina, ligando as bandas Z dos sarcômeros de miofibrilas adjacentes até o sarcolema (segundo, Lazarides, 1980).

No músculo esquelético, em grandes amplitudes de estiramento, a recuperação dos filamentos de actina e miosina diminuem levando a um pequeno número de pontes ligadas, num estado de equilíbrio entre a actina e miosina (Haugen e Sten-Knudsen, 1981). A rigidez passiva medida por diferentes testes mecânicos será constituída por uma rigidez inicial devido a este fenômeno. Embora, Bagni e colaboradores (1995), não constatarem a presença desse fenômeno. Bagni e colaboradores (1995) concluíram que o pequeno número de pontes entre a actina e miosina era negligenciado comparado ao papel da titina na elasticidade passiva.

Alguns trabalhos têm demonstrado que as pontes entre actina e miosina não estão num estado de equilíbrio estável, porém em equilíbrio rápido entre ligação e separação (Bagni et al., 1992; Mutungi e Ratanunga, 1996). Existe uma incompatibilidade temporal entre a frequência dos ciclos de ligação-liberação e os tempos de relaxamento (Bagni et al., 1992; Mutungi e Ratanunga, 1996). A influência das pontes residuais de actina-miosina sobre a elasticidade passiva ainda é objeto de discussão entre os autores (Proske e Morgan, 1999).

A atividade locomotora irá depender de sua estrutura muscular, e de sua composição nos tipos de fibras (Punkt et al., 2004). A estrutura muscular, por sua vez, está relacionada às propriedades mecânicas musculares e irá influenciar a capacidade funcional do músculo, sua habilidade para gerar força, velocidade e duração do movimento (Maltin et al., 2001; Goubel e Leiseil-Corbeil, 2003).

1.3.2. Estudo da maturação somática e da ontogênese reflexa

Todos os seres vivos aumentam de tamanho desde o seu nascimento até atingirem as dimensões máximas características de cada espécie, é o crescimento. Ademais, as estruturas dos órgãos, e dos distintos sistemas que compõem o ser, vão crescendo, e ao mesmo tempo, se tornando maduras; ou seja, exercendo suas funções específicas, é o que se denomina desenvolvimento. Contudo, o crescimento e o desenvolvimento biológico não necessariamente prosseguem em comum acordo com a idade cronológica, isto repercute nas dimensões da estrutura e no desempenho das funções. Este descompasso pode ser causado por perturbações, oriundas do meio interno ou externo, surgidas em períodos, chamados críticos do desenvolvimento (Morgane et al., 1993). Este fato pode ser medido e permite avaliar o progresso estrutural e fisiológico do indivíduo. O crescimento no homem, por exemplo, é normalmente avaliado por parâmetros, tais que altura; peso e perímetro cefálico. Já o desenvolvimento pode ser avaliado por medidas das funções. Assim, parâmetros de maturação somática e do desenvolvimento sensório-motor têm sido avaliados e utilizados como indicadores do

crescimento e desenvolvimento em particular do Sistema Nervoso, em várias espécies (Fox, 1965).

Na ontogênese do sistema nervoso, como já mencionado, foram identificados “períodos críticos” de maior vulnerabilidade a agressões (Morgane et al., 1978). O primeiro período crítico ocorre durante a multiplicação e organização iniciais de neuroblastos que, nos mamíferos, acontece no período pré-natal (Morgane et al., 1993). O segundo corresponde no rato à fase de aleitamento (Winick e Noble, 1966), onde acontece crescimento rápido do encéfalo, com migração e diferenciação neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização evidentes (Dobbing, 1964; Morgane et al., 1978). Várias evidências experimentais e clínicas demonstraram que agressões nestes períodos críticos podem modificar os eventos ontogenéticos sequenciais com efeitos diversos e persistentes sobre o sistema nervoso (Dobbing, 1970; Morgane et al., 1993, Manhães de Castro et al., 2001).

Entre os fatores exógenos que podem alterar os eventos do crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso estão as alterações nutricionais. Há drásticas mudanças morfofuncionais em neurônios quando essas agressões ocorrem na etapa vulnerável (Noback e Eisenman, 1981; Manhães de Castro et al., 2001). Estas mudanças poderão ser parcialmente reversíveis ou não, em função da magnitude da agressão e dos fatores ambientais a que são submetidos os indivíduos (Levitsky e Barnes, 1972).

Uma das alterações nutricionais mais estudadas é a desnutrição. Vários modelos experimentais de desnutrição têm sido utilizados há décadas para reproduzir em animais alterações semelhantes às aquelas que ocorrem no homem desnutrido. Durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso, a desnutrição pode ser imposta através do leite materno, ou seja, submetendo a mãe à desnutrição. Em ratos, vários ajustes comportamentais maternos

exercem importante papel na determinação da disponibilidade de energia para a prole (Crnic, 1980). A alimentação materna deficiente não afeta unicamente o crescimento dos filhotes, ela altera, sobretudo um conjunto de comportamentos interativos materno-infantis, acarretando déficit na conduta exploratória do filhote (Massaro et al, 1974, Riul et al., 1999).

A desnutrição neonatal está associada a uma variedade de déficits cognitivos e comportamentais através da vida (Wachs, 1995). Considerando que a alimentação fornece energia e nutrientes necessários à maturação estrutural e ao desenvolvimento funcional do sistema nervoso (Morgane et al., 1993), a deficiência nutricional neste período pode induzir defeitos morfogenéticos com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e aquisição de padrões fisiológicos maduros (Dobbing, 1964; Winick e Noble, 1966; Noback e Einsenman, 1981). No sistema nervoso, a desnutrição pode produzir alterações químicas e estruturais que serão consolidadas no tecido adulto (Morgane et al., 1978). Estas alterações podem ser responsáveis por ajustes funcionais, particularmente sobre a expressão comportamental (Wauben e Wainwright, 1999). Regiões encefálicas importantes no controle de determinados comportamentos podem ser irreversivelmente afetadas pela desnutrição no início da vida. Uma destas regiões é o hipotálamo, que atua de forma crucial no controle do comportamento alimentar (Plagemann et al., 2000a).

Na fase de maturação do sistema nervoso, a diferenciação de suas células está ligada à capacidade do neurônio em sintetizar, liberar e inativar um ou mais neurotransmissores e receber informações de outros neurônios ou de células da glia (Emerit et al, 1992). O aumento no nível de neurotransmissor pode preceder a maturação de conexões sinápticas, o que evidencia sua atuação no desenvolvimento da rede neuronal. Nesse período, ocorre expressão transitória de neurotransmissores, seus metabólitos, enzimas e respectivos receptores (Jeager e Joh, 1983;

Daval et al., 1987; Bar-Peled et al., 1991). No sistema nervoso de roedores os neurotransmissores parecem exercer papel crítico na organização das conexões celulares (Lauder, 1993).

A seqüência de eventos apresentada pelo sistema nervoso durante o desenvolvimento pré e pós-natal determina sua estrutura, composição neuroquímica e função presentes na vida adulta (Morgane et al., 1993). Assim, o comportamento, expressão máxima da função nervosa, está na dependência do desenvolvimento adequado das regiões específicas do sistema nervoso. Quando incidem agressões durante os períodos críticos ontogenéticos deste sistema, o desenvolvimento subsequente é comprometido, conseqüentemente padrões comportamentais podem ser modificados (Morgane et al, 1978). Entre estes, ressalta-se o comportamento alimentar.

Estudos experimentais e em humanos, revelam a importância das análises de maturação somática para avaliação do crescimento e desenvolvimento bem como o estado nutricional (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Barker et al., 1993). Em humanos, as avaliações do peso, altura e perímetro cefálico em relação à idade são largamente usadas (OMS, 1995). As medidas somáticas do perímetro cefálico em humanos são relacionadas ao tamanho cerebral (Ivanovic et al., 1995; Weaver e Christian, 1980). Há evidências de que o perímetro cefálico pode refletir deficiências nutricionais que ocorreram no início da vida (Malina et al., 1975; Spurr et al., 1983).

Para compreender-se a importância dos parâmetros somáticos como ferramenta em estudos, vale a pena detalhar o estudo que originou a hipótese do fenótipo protetor (Barker e al. 1993). Barker e colegas apresentaram um estudo de seguimento com uma amostra de 1586 homens, nascidos entre 1907 e 1924, na Inglaterra, dos quais foram obtidos o perímetro cefálico e peso ao nascer. Os autores conseguiram demonstrar uma relação entre índice de mortalidade por doenças cardiovasculares e peso ao nascer. Assim, homens com menor perímetro cefálico ou menor peso ao nascer, ou ambos, tinham maior risco de morrer em decorrência de doenças

cardiovasculares. Barker e colegas (1993) sugeriram que um perímetro cefálico pequeno e baixo peso ao nascer refletem o padrão de crescimento fetal, e isto estaria associado às mudanças em certos tecidos, incluindo vasos sanguíneos, e pâncreas. Essas transformações “programariam” a pressão sanguínea, e o metabolismo da glicose e insulina, e as doenças cardiovasculares na idade adulta. O estudo mostrou, pela primeira vez, que a falha no crescimento fetal é seguida por um aumento nas taxas de morte por causas cardiovasculares, na idade adulta. Outros autores, por sua vez, num estudo retrospectivo, realizado em 1990, na Jamaica revelam a partir de uma amostra de 2.394 nascimentos que mulheres com baixo índice de massa corporal têm filhos menores, e com perímetros cefálicos menores (Thame et al., 1997).

Em ratos, são utilizadas medidas semelhantes de crescimento somático e das características físicas (Smart e Dobbing, 1971; Silva et al., 2005; Deiró et al., 2006). Um estudo recente descreve o método utilizado em ratos para a avaliação do desenvolvimento somático, através da utilização de um paquímetro (Silva et al., 2005). Esse método considera os pontos anatômicos como base para as medidas: Eixo antero-posterior do crânio; Eixo látero-lateral do crânio; Comprimento da cauda e Eixo longitudinal do corpo (Silva et al., 2005). Outros estudos avaliam a maturação das características físicas como abertura dos olhos, abertura do conduto e do pavilhão auditivo e a irrupção dos incisivos durante o desenvolvimento somático (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971; Deiró et al., 2006). A administração de inibidores seletivos da recaptação da serotonina durante o período neonatal em ratos é capaz de diminuir as medidas de crescimento somático e retardar o aparecimento das características físicas (Deiró et al., 2006). A desnutrição neonatal também é capaz de diminuir as medidas de crescimento somático e retardar o aparecimento das características físicas (Silva et al., 2006). As medidas de maturação somática

caracterizam não apenas o desenvolvimento encefálico, mas também corporal, e são indicadores do desenvolvimento normal (Silva et al., 2006).

O desenvolvimento pós-natal envolve a maturação de diversos sistemas (Fox, 1965). A aplicação de testes neurológicos e comportamentais também serve como indicadores do desenvolvimento normal (Fox, 1965; Silva et al., 2005). Fox (1965) descreve no camundongo respostas reflexas como: preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, geotaxia negativa, resposta ao susto e reação de aceleração. Durante o desenvolvimento pós-natal imediato algumas respostas são fracas e lentas (Fox, 1965). A partir do segundo dia de idade, no camundongo, essas respostas tornam-se mais fortes e vigorosas, especialmente aquelas relacionadas à orientação corporal e localização do mamilo das mães como a resposta de recuperação do decúbito e de geotaxia negativa (Fox, 1965). Os reflexos de recuperação de decúbito e geotaxia negativa estão relacionados aos padrões locomotores do rato neonato (movimentos de rastejar e o «pivoting»)(Fox, 1965). O « pivoting » parece ser um tipo de atividade locomotora de busca, enquanto que o rastejar é uma resposta unidirecional estímulo-direcionada (Fox, 1965). Dentre os reflexos alguns estão relacionados à sobrevivência do animal como o reflexo de aversão. Inicialmente essas respostas são fracas, mas a partir do desenvolvimento do músculo–esquelético dos animais tornam-se fortes e são facilmente reconhecidas (Fox, 1965). O reflexo de preensão palmar simula a resposta de Babinski no homem (Fox, 1965). Alguns reflexos como o de resposta ao susto, colocação das vibrissas e reação de aceleração, no entanto, necessitam de um maior desenvolvimento dos sistemas orgânicos do animal. Fox (1965) relata que é necessário o desenvolvimento da audição para a resposta ao susto ; enquanto que para os reflexos de colocação pelas vibrissas e reação de aceleração, os animais precisam de uma habilidade motora maior para que consigam

desempenha-los. O estudo do padrão de maturação reflexa é utilizado para demonstrar a maturação apropriada do sistema nervoso central durante o desenvolvimento (Smart e Dobbing, 1971). Alterações no aparecimento de reflexos em ratos desnutridos precocemente indicam relação entre desenvolvimentos bioquímico e estrutural durante a ontogênese do sistema nervoso (Adlard e Dobbing, 1971). O uso de testes neurológicos durante a desnutrição pré e pós-natal tem confirmado o retardo na ontogênese reflexa (Rodrigues-Perez et al., 1992 ; Barros et al., 2006).

Os reflexos primitivos são constituídos por respostas involuntárias, muitas das quais evidentes ainda antes do nascimento (Mandich et al., 1994; Ungerer e Sigman, 1983). Os reflexos são incorporados em comportamentos voluntários elaborados mais tarde; eles constituem unidades de uma coordenação elementar a partir das quais são possíveis organizações mais complexas do comportamento (Olhweiler et al., 2005). O estudo da ontogênese reflexa é de grande importância para a avaliação da integridade funcional do indivíduo (Olhweiler et al., 2005), pois constitui uma etapa inicial do desenvolvimento motor e servirá como base para o estudo da evolução da atividade locomotora.

2.OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar, as repercussões da desnutrição intra-uterina sobre o desenvolvimento do sistema locomotor no rato.

ESPECÍFICOS:

- ❖ Realizar análise histológica para observação do efeito da desnutrição intra-uterina sobre a distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares ao desmame e na idade adulta.
- ❖ Realizar a análise das propriedades mecânicas de dois diferentes músculos, um músculo postural (solear) e outro não-postural (extensor longo dos dedos–EDL) aos 25° e 90° dia de vida pós-natal, após a desnutrição gestacional;
- ❖ Avaliar o desenvolvimento somático e sensório motor de ratos, após a agressão nutricional gestacional, através da verificação do desenvolvimento das características físicas e da ontogênese de reflexos durante o período neonatal;
- ❖ Analisar o desenvolvimento da atividade locomotora durante o período de aleitamento e na idade adulta;
- ❖ Comparar os resultados das avaliações do animal adulto com as do período pós-natal, para avaliar as repercussões tardias da agressão nutricional instituída precocemente.

3.HIPOTESES

- ❖ A desnutrição materna durante a gestação acarreta alterações persistentes na proporção dos tipos de fibras do músculo solear e EDL.
- ❖ A desnutrição pré-natal causa modificações persistentes nas propriedades mecânicas em diferentes tipos de músculos.
- ❖ O retardo na maturação das características físicas, na ontogênese dos reflexos e as mudanças na estrutura e função dos músculos esqueléticos conseqüente à desnutrição pré-natal repercutem no desenvolvimento da atividade locomotora.
- ❖ As modificações da atividade locomotora são persistentes até a idade adulta nos animais desnutridos durante a gestação.

4. DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA E DESENVOLVIMENTO LOCOMOTOR: ANALISE DAS PROPRIEDADES MUSCULARES E DOS ELEMENTOS SOMÁTICOS E SENSORIAIS RELACIONADOS COM A ATIVIDADE LOCOMOTORA

RESUME EN FRANÇAIS

4. DENUTRITION INTRA-UTERINE E DEVELOPPEMENT LOCOMOTEUR: ANALYSE
DES PROPRIETES MUSCULAIRES ET DES ELEMENTS SOMATIQUES ET
SENSORIELS ASSOCIE A L'ACTIVITE LOCOMOTRICE

4.1. Etude des propriétés structurales et mécaniques du muscle squelettique

4.1.1 Matériel et Méthodes

4.1.1.1. Animaux et groupes expérimentaux

Cette étude a été réalisée à l'Université de Technologie de Compiègne.

Des rates femelles Wistar ont été accouplées avec des mâles de même origine. La gestation des mères a été confirmée par examen du frottis vaginal et noté J0. A partir de J0, les

femelles gestantes ont été séparées en deux groupes selon leur alimentation pendant la période de gestation, soit une alimentation appauvrie en protéines (7.8% caséine), soit une alimentation contrôle (17% caséine). Le lendemain de la parturition, afin de standardiser les portées, elles sont limitées à 6 rats mâles. 2 groupes sont ainsi formés en fonction de l'alimentation de la mère pendant la gestation, Groupe D (Dénutri, 7.8% caséine) et groupe C (Contrôle, 17% caséine) (Table 1).

Après la parturition, les mères des deux groupes ont reçu une alimentation contrôle pour que la dénutrition des rats issus des portées ne se fasse que pendant la période de gestation. Du sevrage à 60 jours, tous les rats ont été alimentés avec une diète à 17% de protéine puis à partir de 2 mois, ils ont reçu une diète à 12% de protéine telle que recommandée par l'American Institute of Nutrition (AIN) (Reeves et al, 1993).

Les caractéristiques mécaniques ont été étudiées sur le muscle soleus et EDL des rats des deux groupes à l'âge de 25 et 90 jours.

4.1.1.2. Prélèvement des muscles

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritoneale de pentobarbital sodique (30mg/kg). A partir d'une incision longitudinale de la face latérale de la patte postérieure, le soleus et l'Extensor Digitorum Longus (EDL) sont retirés avec précaution soit pour analyse histologique, soit pour analyse biomécanique. Les muscles servant à l'étude histologique sont congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide et conservé dans l'azote jusqu'au jour d'analyse. Les muscles servant à l'étude des caractéristiques mécaniques sont quant à eux

rapidement mis en place dans une chambre dans laquelle circule une solution physiologique tamponnée, oxygénée et maintenue à 25°C.

4.1.1.3. Analyse histologique

Des coupes transversales de 10µm ont été réalisées sur muscles congelés avec un cryostat (figure 4A et 4B). Les coupes ont été colorées par la technique de myosin-ATPase décrite par Boone et Kaiser (1970) (figure 5A et 5B). La composition du muscle dans les différents types de fibres a été déterminée en comptant environ 1500 fibres.

4.1.1.4. Tests biomécaniques

Aussitôt après le prélèvement du muscle, celui-ci est relié par son extrémité proximale à un capteur de force et son extrémité distale est attachée à une tige métallique reliée au vibreur électromagnétique permettant de réaliser des perturbations de longueur (figures 6 et 7).

Pour les tests en actif, le muscle est ajusté à sa longueur optimale L_0 , définie comme étant la longueur pour laquelle la tension maximale est développée lors du twitch. Des séries de double controlled release (figure 8) ont été réalisées à partir de la tension tétanique afin d'établir la courbe tension-extension et la relation force-vitesse (figures 9 et 10).

La composante contractile (CC) du muscle a été évaluée à travers:

- ❖ la force développée lors d'un twitch (P_t)
- ❖ la force développée lors d'un tétanos (P_0)

- ❖ la cinétique du twitch (temps de contraction - CT et temps de demi-relaxation - HRT)
- ❖ La vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}) à partir de la relation force-vitesse
- ❖ la résistance à la fatigue grâce au test de fatigue décrit par Burke (1973)

La Composante élastique série (CES) du muscle a été évaluée à partir de la relation tension-extension par le calcul:

- ❖ des compliances à P_0 et 20% de P_0
- ❖ de l'aire sous la courbe représentant l'énergie potentielle
- ❖ de l'extension maximale

Pour les tests en passif permettant de caractériser la CEP, le muscle a été ajusté à la longueur L_s définie comme la longueur pour laquelle le muscle développe une tension passive de 10mN. A partir cette longueur, le muscle a été soumis à trois tests :

- ❖ un test de relaxation incrémental consistant en 4 extensions successives de 5% de L_s maintenue pendant 80 secondes, les étirement étant réalisés à une vitesse de 500mm/sec (figure 12).
- ❖ un test d'étirement à faible vitesse (0.1mm/sec) jusqu'à une longueur supérieure à 125% L_s (figure 13).
- ❖ un test de relaxation à 15% L_s maintenue pendant 80 secondes avec des vitesses d'étirement différentes (1 L_s /s, 2 L_s /s, 5 L_s /s, 10 L_s /s, 15 L_s /s, 20 L_s /s et 30 L_s /s) (figure14).

Les données de force passives ont été normalisées par rapport à la surface de section du muscle calculée selon les équations décrites par Ranatunga et al (1982) et Gregorevic et al (2002) afin d'exprimer les valeurs en tension. Pour les tests de relaxation, les tensions dynamiques (σ_d) correspondent au maximum de tension enregistré pendant la phase dynamique du test alors que les tensions statiques (σ_s) correspondent aux valeurs stables de tension observées à la fin de la période de relaxation. Pour le test d'étirement à faible vitesse, la tension et la raideur à 125% L_s sont calculées ainsi que le module tangentiel représenté par la pente de la partie linéaire de la relation contrainte-déformation. Pour le test de relaxation à différentes vitesses d'étirement, il est noté une évolution non monotone de la force pendant le phase d'allongement avec un point de « cassure » (noté P1) dans le signal de force dépendant de la vitesse d'étirement (figure 14). De ces tests, il est possible de différencier le comportement élastique, visco-élastique et visqueux tel que proposé par Mutungi et Ranatunga (1996) (Figure15).

4.1.2. Analyse des résultats

Poids du corps et des muscles

Les mères mal nourries et leurs progénitures présentent une baisse du poids corporel par rapport au groupe contrôle (figure 16A et 16B).

Les résultats concernant les poids musculaires montrent que la dénutrition a provoqué :

- ❖ une diminution des poids absolus des muscles soleus et EDL à 25 et 90 jours (figure 17A, 17B).
- ❖ une diminution du poids relatif du soleus uniquement à 25 jours(figure 17C).
- ❖ une diminution du poids relatif de l'EDL à 25 et 90 jours(figure 17D).

Analyse histologique de muscles

Les soleus des rats de groupe D ont montré une augmentation du pourcentage de fibres IIa à 25 et 90 jours (figure 18A). Par contre, il y a une réduction dans la proportion de fibres IIa et une augmentation dans le pourcentage de fibre IIb dans l'EDL des rats du groupe D à 25 et 90 jours (figure 18B).

Analyse des propriétés mécaniques des muscles

A l'âge de 25 jours, la dénutrition pendant la gestation a entraîné une diminution de la force absolue et relative et une augmentation de la Vmax dans le soleus et l'EDL (Tableau 2). A 90 jours, les résultats montrent une diminution des forces absolues sur l'EDL, une augmentation de la force tétranique relative sur les deux muscles, ainsi qu'une augmentation de la Vmax sur le soleus et l'EDL (Tableau 2). Les paramètres de la cinétique de twitch ainsi que la fatigabilité (tableau 3) ne sont pas modifiés par la dénutrition quel que soit l'âge ou le muscle.

A l'âge de 25 jours, sous l'effet de la dénutrition, il est noté une diminution de la compliance de la CES dans le soleus alors qu'une évolution inverse est observée dans l'EDL (tableau 4). A 90 jours, on note une légère augmentation non significative de la compliance sous l'effet de la dénutrition fœtale.

L'ensemble des paramètres dérivés des tests en condition passive permettant de caractériser la CEP montre que la raideur de cette composante est augmentée dans les muscles soleus et EDL à 25 jours sous l'effet de la dénutrition fœtale ; cette augmentation de raideur n'est

plus observée à 90 jours (figure 19, tableau 5, tableau 6). Le test de relaxation montre aussi que la viscosité de la CEP est elle aussi augmentée à 25 jours dans les deux muscles (tableau 6).

4.1.3. Discussion

Le modèle expérimental de dénutrition pendant la gestation par une réduction du contenu en protéine est un outil usuel pour tester les modifications de la croissance de la mère et du fœtus (Ozanne e Hales, 1999). Dans la présente étude, les rates gestantes nourries par une diète pauvre en protéine montrent un poids corporel inférieure aux mères du groupe contrôle à partir de la troisième semaine de gestation. En accord avec plusieurs études (Ozanne et al., 1999 ; Snoeck et al., 1990 ; Almeida et al., 1996), les poids des rats du groupe D sont eux aussi inférieurs à ceux du groupe C. Le mécanisme responsable de cet effet peut être relié au métabolisme maternel, à l'environnement hormonal, au flux sanguin utérin et ombilical et aux transferts placentaires de nutriments (Harding, 2001). Ainsi, la nutrition maternelle peut affecter la croissance fœtale et son développement par l'intermédiaire de la disponibilité des nutriments offerts au fœtus mais aussi par de possibles paramètres métaboliques tel que les facteurs glycémiques et insulinémique puisqu'il a été montré que les tissus insulino-dépendants subissent d'importantes modifications en réponse à la restriction protéique maternelle (Ozanne et Hales, 1999).

Dans notre étude, la dénutrition maternelle a provoqué l'atrophie des muscles soleus et EDL à court terme mais aussi à long terme. Zhu et al (2004) ont montré, chez la brebis, que la restriction maternelle diminue la synthèse sans modifier la dégradation protéique au niveau des muscles du fœtus, phénomène pouvant alors accélérer la baisse de poids musculaire. A en juger

par la diminution du poids musculaire relatif au poids corporel chez les animaux de 25 jours, l'atrophie musculaire n'est pas la seule conséquence de la diminution de poids corporel, indiquant un effet plus marqué de la dénutrition intra-utérine sur le muscle par rapport aux autres tissus. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse selon laquelle, pendant la privation nutritionnelle, le fœtus maintient la croissance des tissus nobles comme le cerveau au détriment d'autres structures, et que la dénutrition affectera préférentiellement les tissus sensibles à l'insuline comme le muscle squelettique (Hales et Barker, 1992 ; Heywood et al., 2004 ; Albuquerque et al., 2006). Enfin, il est à noter que la réalimentation avec une diète contrôlée entraîne une plus grande croissance relative du muscle jusqu'à 90 jours.

Les rats du groupe D montrent une plus grande proportion de fibres de type IIa dans le soleus à 25 et 90 jours. A l'opposé, Howells et al (1978) rapportent des modifications non permanentes dans la proportion des différents types de fibres du soleus de rats dénutris pendant la gestation et l'allaitement. Une autre étude a montré que les rats dénutris pendant la gestation et l'allaitement puis nourris ensuite normalement pendant 5 mois ne subissent aucune modification dans la taille, le nombre ou le type de fibres dans les muscles soleus (Bedi et al., 1982). Ces différences dans les résultats peuvent être liées aux différences dans le mode d'induction de la dénutrition ainsi qu'à l'âge des animaux. Concernant l'EDL, il est noté une réduction de la proportion des fibres IIa et une augmentation du pourcentage de fibre IIb à 25 et 90 jours. Ces modifications dans les caractéristiques histologiques de l'EDL liées à la dénutrition sont en accord avec d'autres travaux (Howells et al., 1978 ; Zhu et al., 2006). Pour les muscles rapides, il semble que ce soit la quantité de calories ou le contenu en protéine pendant la période critique de développement qui ait des conséquences à long terme. Le mécanisme mis en cause peut alors être associé au métabolisme spécifique de ces muscles, la sensibilité à l'insuline étant plus importante dans les fibres de type I que dans les fibres de type IIa (He et al., 2001). Puisque les fibres IIb

sont moins dépendantes de la signalisation insulinémique (Nyholm et al., 1997), une augmentation de la proportion de ce type de fibre peut alors être attendue. Ces données confortent grandement la théorie selon laquelle l'altération de développement du muscle squelettique en réponse à la dénutrition maternelle prédispose le muscle des rats de la portée à une résistance à l'insuline. Enfin, il est connu que les hormones thyroïdiennes modulent l'expression de la myosine pendant le développement musculaire (di Maso et al., 2000). De tels changements peuvent être un facteur influençant la proportion des différents types de fibre pendant le développement musculaire puisqu'il a été montré que la dénutrition calorique induit des changements du statut thyroïdien (Shader et al., 1977 ; Passos et al., 2002 ; Lisboa et al., 2008).

Des diminutions de P_0 et P_t sont observées dans les soleus et EDL des rats à 25 jours. A 90 jours, seuls les EDL montrent une réduction dans ces valeurs de force. Ce dernier résultat met en avant la possibilité que la restriction protéique pendant la période critique de développement peut avoir des conséquences à long-terme. Les forces téaniques relatives sont par ailleurs augmentées dans les muscles soleus et EDL à 25 et 90 jours. Sur muscle isolé, la force produite par le muscle est fonction à la fois de sa surface de section physiologique mais aussi de l'espace interfibrillaire et de la proportion de tissu conjonctif. Il est peu probable que les 20% d'augmentation de la force relative puissent être le seul résultat de l'augmentation de la surface de section physiologique du muscle puisque Wank et al (2000) n'ont rapporté, chez le porcelet dénutri pendant la gestation, aucune modification de l'angle de pennation dans les fléchisseurs plantaires. Bedi et al (1982) n'ont par ailleurs révélé aucune modification de la proportion de tissu conjonctif dans le soleus et l'EDL de rat dénutri pendant la gestation et l'allaitement. Enfin, Prakash et al (1993) ont observé une diminution du pourcentage d'espace interfibrillaire dans le diaphragme de rats jeunes et adultes dénutris pendant le développement fœtal. Ce dernier résultat peut alors expliquer, au moins en partie, l'augmentation de la force téanique observée dans notre

étude. Cependant, les changements dans les proportions des différents types de fibres doivent aussi être considérés, Bottinelli et al (1991) rapportant que la force par unité de surface est moins importante dans les fibres lentes que dans les fibres rapides.

Les temps de contraction (CT) et de demi-relaxation (HRT) sont des paramètres dépendants du type de fibre et des mouvements calciques (Berchtold et al., 2000). Nos résultats ne montrent aucune modification de CT et de HRT. Cette absence d'effet de la dénutrition sur la cinétique de twitch n'est donc pas en accord avec l'enrichissement des muscles en fibres rapides. Cependant, en étudiant ces paramètres sur muscle entier, des différences dans la durée du twitch peuvent aussi résulter de changements de raideur de la Composante Élastique Série (CES) (Hill, 1951). Dans notre étude, nous avons observé que la dénutrition maternelle entraîne une augmentation de raideur de la CES sur le soleus de 25 jours, alors qu'un effet contraire est obtenu sur les EDL de 25 jours, et enfin qu'aucun changement significatif n'est noté sur les muscles adultes. L'influence de la CES sur la cinétique de twitch ne peut donc pas expliquer le maintien de CT et de HRT. Finalement, des modifications dans les mouvements calciques doivent être pris en compte. Comme nous l'avons déjà mentionné, la dénutrition entraîne des modifications du statut thyroïdien, de tel changement diminuant la concentration mais aussi l'activité des pompes calciques (Arruda et al., 2005 ; Harrison et al., 1996). Ces altérations peuvent alors ralentir la cinétique contractile et donc, contrecarrer l'accélération de la cinétique de twitch attendu du fait de l'enrichissement des muscles en fibres rapides observé dans notre étude.

La dénutrition fœtale n'a pas entraînée de modification de la résistance à la fatigue dans les soleus et EDL à 25 et 90 jours telle qu'attendue au vu des modifications des caractéristiques histologiques. En effet, il est admis que les unités motrices de types I sont résistantes à la fatigue, contrairement aux unités motrices de type IIa et IIb, les IIb étant par ailleurs les plus fatigables (Burke et al, 1973). En fait, cette inaltération de la résistance à la fatigue semblerait provenir de

modifications du métabolisme musculaire oxydatif liées à la dénutrition (White et al, 2000 ; Lefaucheur et al, 2003).

La dénutrition maternelle a entraîné une augmentation de V_{max} dans les muscles soleus et EDL chez les animaux de 25 et 90 jours. Bottinelli et al (1991) ont montré que V_{max} est inférieure dans les fibres de type I que dans les fibres rapides, la valeur moyenne observée dans les fibres IIa étant quant à elle plus faible que celle des fibres IIb. Les effets de la malnutrition intra-utérine sur la V_{max} observés dans notre étude peuvent donc être liés à l'augmentation du pourcentage de fibre IIa et IIb dans les soleus et EDL, respectivement.

Les éléments élastiques connectés en série avec les éléments contractiles incluent à la fois une fraction passive (i.e. les tendons) et une fraction active (i.e. les ponts actine-myosines) (Hill, 1951). Ainsi, des modifications de raideur de la CES peuvent être liées à des changements dans ces deux fractions. Grâce à l'utilisation de modèles animaux entraînant une adaptation des caractéristiques typologiques du muscle, il a été montré qu'une augmentation du pourcentage de fibre lente est associée à une augmentation de raideur de la CES, alors qu'un enrichissement en fibre rapide est accompagné par une diminution de raideur de la CES (Goubel e Marini, 1987. Almeida-Silveira et al., 1994 ; Canon e Goubel, 1995 ; Canon et al., 1998). Chez les rats de 90 jours, il est noté une légère augmentation non significative de la compliance de la CES dans les soleus et EDL. Ce résultat peut être lié à une augmentation de la compliance de la partie active (du fait des modifications de la typologie observées dans ces deux muscles) parallèlement à une augmentation de la raideur de la partie passive de la CES, cette dernière atténuant l'effet de l'adaptation des caractéristiques typologiques du muscle sur la raideur de la CES. Chez les rats de 25 jours, la privation nutritionnelle a produit une augmentation de compliance de la CES sur l'EDL, alors que des variations opposées sont observées sur le soleus. Pour l'EDL, on peut supposer que l'augmentation de la compliance de la CES est en partie liée aux changements de

type de fibres. Pour le soleus, la diminution de compliance induite par la dénutrition résulte vraisemblablement d'adaptation opposées dans les fractions passives et actives de la CES. Concernant la partie active, les soleus des rats dénutris s'enrichissent en fibres rapides. Un tel enrichissement a aussi été montré par des techniques d'hypoactivité ou d'hyperactivité et est associé à une augmentation de la compliance de la CES (Goubel e Marini, 1987. Almeida-Silveira et al., 1994 ; Canon e Goubel, 1995 ; Canon et al., 1998). Néanmoins, dans l'étude présente, nous observons une diminution de compliance. Pour ce muscle, il peut alors être suggéré qu'une importante augmentation de raideur de la fraction passive de la CES contrecarre la diminution de raideur de la fraction active.

Enfin, nos résultats montrent que les propriétés élastiques passives sont elles aussi modifiées par la dénutrition fœtale. En effet, l'ensemble des tests montre une augmentation de la raideur des éléments élastiques en parallèle, cette augmentation de raideur étant observée à la fois en condition dynamique et statique ainsi que pour de faibles ou d'importants étirement. Cependant, il est à noter que ces modifications ne sont observées que sur les soleus et EDL des rats de 25 jours, aucune différence n'étant notée à 90 jours. Les propriétés passives du muscle sont dépendantes des structures membranaires, et plus spécifiquement de la concentration et du type de collagène présent dans les membranes, mais aussi de protéines de structure telle la desmine ou la titine. De nombreuses études ont fait le lien entre contenu en collagène et propriétés mécaniques passives (Kovanen et al., 1984; Gosselin et al., 1998; Ducomps et al., 2003; Alnaqueeb et al., 1984). Ainsi, des études utilisant des techniques d'entraînement chez le mammifère ont montré une augmentation de la raideur passive concomitante à l'augmentation du contenu en collagène et des cross-linking (Kovanen et al. 1989, Ducomps et al. 2003, Gosselin et al., 1998). Les études sur les processus de vieillissement ont elles aussi montré cette association entre collagène et raideur passive (Alnaqueeb et al., 1984; Kovanen et al., 1984). Concernant les

effets du statut nutritionnel sur la régulation du collagène musculaire, les résultats sont variés. Roy et al (2006) ne rapportent aucune influence du niveau nutritionnel sur le contenu en collagène du muscle pectoralis de poulet, avec cependant quelques différences dans la structure même du collagène du perimysium. Dans le gastrocnemius de souris adultes dénutries pendant 2 jours, Jagoe et al (2002) rapportent une diminution de l'expression des gènes codant pour de nombreuses protéines comme le collagène. Plus récemment, Stevenson et al (2005) a étudié le profil transcriptionnel de myotubes en condition carentielle. Ces auteurs ont noté une diminution dans l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et la maturation du collagène. Néanmoins, les effets de l'apport nutritionnel pendant le développement fœtal sur le développement du tissu conjonctif musculaire semblent être différents. En effet, Karunaratne et al (2005) montrent une augmentation de la quantité de collagène par unité de surface chez les porcelets ayant eu un apport nutritionnel appauvri pendant la gestation. Dans notre étude, un tel phénomène pourrait expliquer l'augmentation de tension passive observée dans les muscles de rats de 25 jours.

En plus du collagène, d'autres protéines de structures sont source de tension passive. La titine, une protéine filamenteuse de 3MDa, lie la strie Z au filament de myosine. Wang et al (1991) démontrent que les propriétés élastiques passives de la fibre musculaire sont liées à l'expression de l'isoforme de titine. En plus, Toursel et al (2002) ont montré une diminution de la raideur passive dans le soleus de rat suspendu en liaison avec une diminution du contenu en protéine de titine. La protéine de desmine a aussi montré son rôle dans la raideur passive (Salviati et al, 1990, Anderson et al, 2002). Enfin, la téléthonine (Titin-cap) qui a un rôle important dans l'ancrage de la partie N-terminale de la titine sur la strie Z (Trinick et al, 1999) semble aussi avoir une influence sur la raideur passive (Lee et al, 2006). L'étude de Byrne et al (2005) a montré une augmentation de l'expression des gènes de la desmine et de la téléthonine dans le muscle de bœufs dénutris pendant une courte période, révélant alors la possibilité

d'influencer le contenu musculaire dans ces différentes protéines sous l'effet de la dénutrition. Enfin, chez le rat soumis à une alimentation appauvrie en protéines pendant 2 semaines après le sevrage, Oumi et al (2000) ont rapporté des altérations ultrastructurales musculaires. Plus précisément, ces auteurs ont montré une désorganisation au niveau sarcomérique avec rupture de la strie Z prenant un aspect déchiqueté et attribuent cette « désintégration » structurale aux protéines de desmine et de titine. Si telle est le cas, une telle modification de l'organisation du réseau protéique sarcomérique pourrait alors entraîner une augmentation de la raideur passive. En effet, Anderson et al (2001) ont rapporté une augmentation de raideur passive chez des souris génétiquement modifiées dépourvues de desmine (Anderson et al, 2001), attribuant cette augmentation de raideur à une adaptation des structures passives liées à l'absence de desmine. Les tests de relaxation à différentes vitesses nous ont permis de montrer, sur muscle entier, que la réponse en tension à l'allongement en condition passive consiste en un comportement visqueux, viscoélastique et élastique tel qu'observé sur fibre isolée de muscle de grenouille (Bagni et al, 1995 ; 1999) ou sur faisceau de fibres de muscle de rat (Mutungi et Ranatunga, 1996 ; 1998 ; Mutungi et al, 2003). Il existe un débat quant à la contribution soit des ponts actine-myosine, soit de la molécule de titine (Hill, 1968 ; Moss et al, 1976 ; Bagni et al, 1992 ; 1995 ; Mutungi et Ranatunga, 1996 ; Mutungi et al, 2003) pour expliquer ce comportement mécanique de la CEP. Cependant, il semble aujourd'hui que pour une majorité d'auteurs, la participation de la molécule de titine et plus précisément la région I de cette molécule soit prédominante dans ce phénomène. Mutungi et Ranatunga (1996) et Mutungi et al (2003) ont rapporté des différences entre fibres lentes et fibres rapides non seulement pour le comportement élastique mais aussi pour les caractéristiques viscoélastiques et visqueuses. Ainsi, de ces travaux, il apparaît une raideur passive mais aussi une viscosité plus importante pour les fibres lentes comparativement aux fibres rapides. Nos résultats montrent, chez les soleus et EDL des rats de 25 jours, une

augmentation non seulement de la raideur passive mais aussi du coefficient de viscosité. Ces variations ne peuvent donc pas s'expliquer en termes d'adaptation des caractéristiques typologiques puisqu'il n'est pas observé d'enrichissement du muscle en fibre lente sous l'effet de la dénutrition. Concernant la viscosité, il semble que cette différence entre les fibres ne soit pas liée à une différence de viscosité myoplasmique (liée au glissement inter-filamentaire), puisque cette différence persiste même après avoir pelé chimiquement, glycériné et placé dans un même bain les 2 types de fibres (Mutungi et Ranatunga, 1996 ; 1998). Ces auteurs attribuent alors cette caractéristique à une structure intrasarcomérique et plus particulièrement à la Titine.

De l'ensemble de ces données, il est alors suggéré que les modifications observées en terme de comportement mécanique passif du muscle sous l'effet de la dénutrition fœtale soit le résultat d'altération dans les structures endosarcomériques et/ou exosarcomériques et dont la molécule de titine pourrait en être le principal acteur.

Nous pouvons donc conclure de l'ensemble de ces résultats que la malnutrition pendant le développement foetal induit des changements aussi bien au niveau des caractéristiques contractiles qu'au niveau des propriétés de la CES et de la CEP avec cependant des différences selon l'âge et les muscles étudiés. Quoiqu'il en soit, il est probable que certaines de ces modifications des caractéristiques mécaniques auront des répercussions sur la fonction posturale et locomotrice.

4.1. Estudo das propriedades estruturais e mecânicas do tecido muscular esquelético

4.1.1. Materiais e Métodos

4.1.1.1. Animais e Grupos Experimentais

Este estudo foi realizado na Université de Technologie de Compiègne - UTC, utilizando o biotério de experimentação e o Laboratório de Biomecânica e Engenharia Biomédica (Unité Mixte de Recherche 6600, filiada ao CNRS – Centre Nationale de la Recherche Scientifique / França).

Para os experimentos realizados na UTC, fêmeas e ratos machos Wistar foram adquiridos diretamente do fornecedor (ÉLEVAGE JANVIER, França), já com a idade adequada para reprodução, para serem acasalados no biotério daquela instituição, a fim de obter as ninhadas e submetê-las aos procedimentos de manipulação nutricional e avaliação da biomecânica muscular. Os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética, Higiene e Segurança da UTC.

Manipulação nutricional: Durante a gestação, as ratas foram alimentadas com uma dieta controle (17% de proteína) de acordo com as recomendações da “AIN-93G” (Reeves et al., 1993) (Grupo Controle - C, n=11) ou uma dieta hipoprotéica e isocalórica (7,8% de proteína) (Grupo Desnutrido - D, n=11) (Tabela 1). Após 24 horas do nascimento, as ninhadas foram limitadas a

seis filhotes machos para cada mãe que foi amamentada com dieta controle. Ao desmame, as ninhadas foram isoladas da mãe e receberam a dieta controle até os 60 dias pós-natal. Os ratos receberam uma dieta de manutenção com 12% de proteína até 90 dias pós-natal (Reeves et al., 1993).

O peso corporal das mães foi registrado a cada 5 dias durante a gestação (Sartorius BP61 MP®, 0.01g sensibilidade). O peso dos filhotes foi registrado ao nascer, no 14º, 25º e 90º dias de vida a fim de acompanhar a evolução ponderal desses animais.

Tabela 1 – Composições das dietas experimentais

Ingredientes	Dieta controle	Dieta hipoprotéica
	(17% de proteína)	(7,8% de proteína)
	g/kg	
Caseína ($\geq 92,5$ de proteína)	183,8	84,3
Amido de milho	645,7	745,2
Óleo de soja	70,0	70,0
Fibras	50,0	50,0
Mix Vitamínico ¹	10,0	10,0
Mix Mineral ²	35,0	35,0
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
L-metionina	3,0	3,0
TOTAL	1000	1000

Valores obtidos a partir da AIN-93G, Reeves et al, 1993.

¹ AIN 93G Mix Vitamínico (mg/kg dieta): ácido nicotínico 30,0; pantotenato de cálcio 16,0; piridoxina-HCl 7,0; tiamina-HCl 6,0; riboflavina 6,0; ácido fólico 2,0; biotina 2,0; cianocobalamina, 25,0; α -tocoferol 150,0; palmitato de retinil 8,0; colecalciferol 2,5 e filoquinona.

² AIN 93G Mix Mineral (mg/kg dieta): cálcio 5,0; fósforo 1,6; sódio 1,0; potássio 2,3; magnésio 0,5; ferro 0,03; zinco 0,03; e cobre 0.01.

4.1.1.2. Preparação dos músculos

Os ratos foram anestesiados, via intraperitoneal, com pentobarbital de sódio (30mg/kg de peso corporal do animal). A partir de uma incisão longitudinal na face lateral da pata posterior, o músculo solear ou o extensor longo dos dedos (EDL) foram dissecados, sob umidificação de uma solução de Krebs-ringer em pH=7,3 composta em millimoles de: NaCl 115,0; NaHCO₃ 28,0, CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 3,1; KCl 3,5; KH₂PO₄ 1,4; Glicose 11,1.

O músculo foi seccionado nos tendões, para utilização na análise histológica ou biomecânica. Para análise histológica, os músculos foram retirados, imersos em isopentano a baixa temperatura e congelados em nitrogênio líquido (- 160°C) até serem examinados. Esse método de congelamento evita a formação de cristais de água no fragmento do músculo graças ao isopentano e fixa sem desnaturar as enzimas a serem caracterizadas. Nessas condições os fragmentos dos músculos congelados podem ser estocados e conservados em tubos mergulhados em nitrogênio líquido por vários meses.

Para análise biomecânica, o músculo foi pesado numa balança digital (Sartorius CP64 ®, divisão 0,1mg). Imediatamente após a pesagem, o músculo foi colocado numa câmara contendo solução de Krebs-Ringer, constantemente agitada, recebendo continuamente uma mistura de gases de 95% de O₂ e 5% CO₂, mantida a uma temperatura de 25°C e pH de 7,3.

4.1.1.3. Análise histológica

Com um criótomo (Jung Frigocut 2800E-Leica), mantido a -20°C, foram obtidas secções transversas (10µm) fixados a um suporte com a ajuda de *TissueTek* (Figura 4A e 4B). Os cortes foram então fixados em lamínulas, sendo secos em temperatura ambiente por um período de 1 a 2 horas antes de iniciar a coloração.

A fim de se obter uma coloração característica da atividade ATPase da miosina foi utilizado o método proposto por Booke e Kaiser (1970). Essa técnica estabelece que reações físico-químicas bem precisas, realizadas em várias etapas, permitem obter uma coloração característica da atividade enzimática específica. Dois parâmetros são essenciais na reação que tem por objetivo determinar de forma quantitativa uma atividade enzimática: o pH e a temperatura.

Os cortes transversais do músculo foram corados em ATPase miofibrilar cálcio-ativada (mATPase), após pré-incubação em diferentes níveis de pH (Booke e Kaiser, 1970) (Figura 5A e 5B). As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação à ATPase após a pré-incubação em meio ácido (pH 4,3 e 4,6), nos três tipos principais: I (fibras lentas oxidativas), IIa (fibras rápidas oxidativas-glicolítica) e IIb (fibras rápidas glicolíticas) e fibras de tipo de intermediário (Int) (Pierobon-Bormioli et al. 1981) (Figura 5A e 5B). Na análise histoquímica, foi empregado um sistema de análise de imagem (Leica Microsystems Imaging Soluções Ltd ©, software QWin V2.7). A composição dos tipos de fibras do músculo foi determinada contando-se aproximadamente 1500 fibras igualmente distribuídas em campos sobre a amostra.

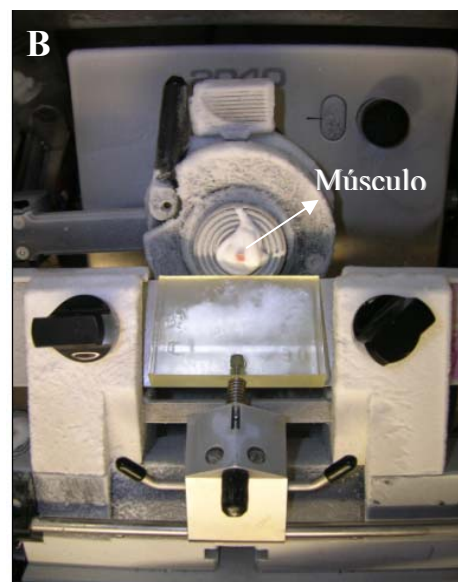


Figura 4. Processamento histológico. A, criótomo a -20°C . B, Músculo durante a realização dos cortes transversais.

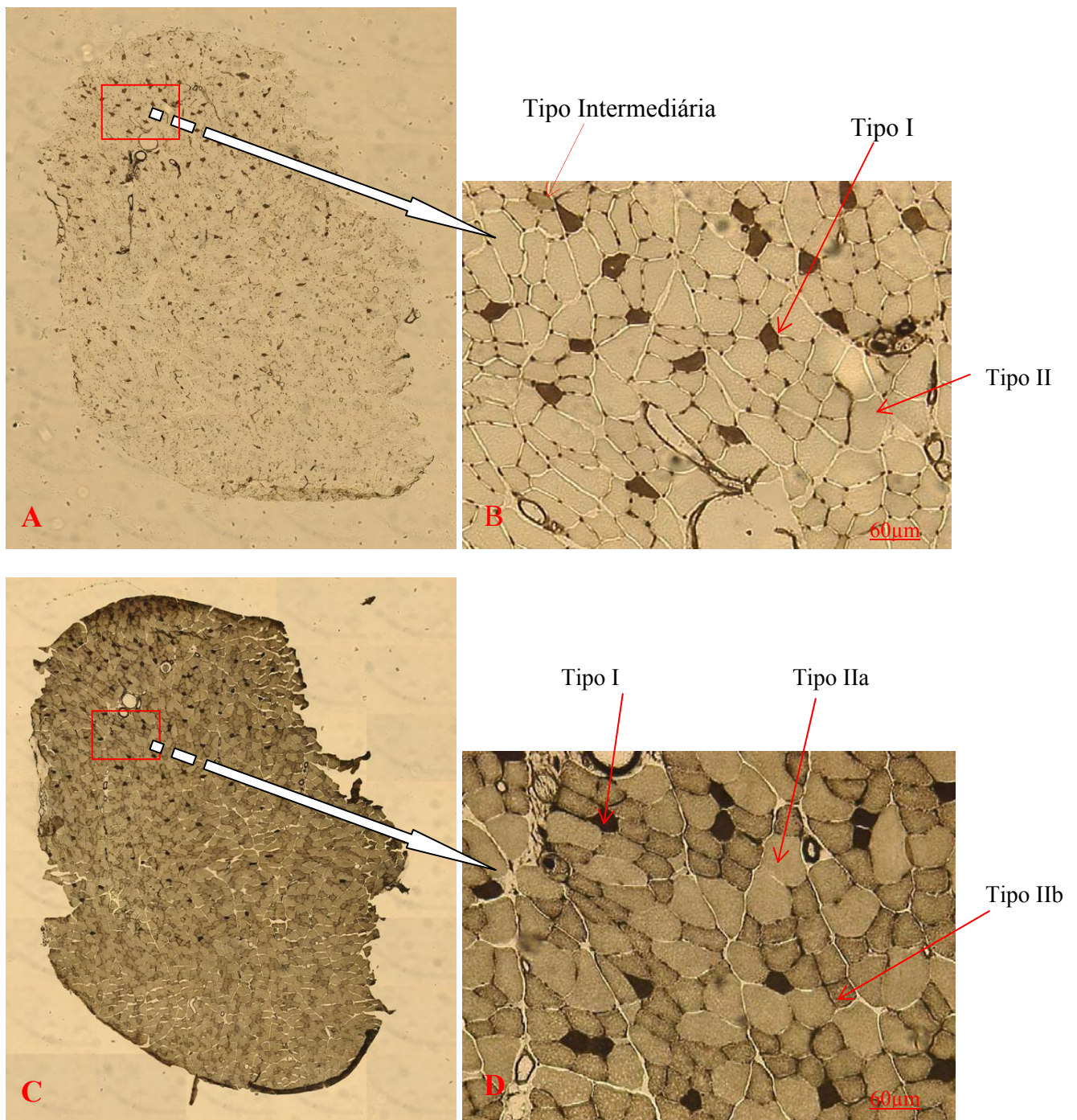


Figura 5. A e C, corte transversal do músculo EDL corado pela técnica da ATPase miofibrilar cálcio-ativada (mATPase) em pH=4,3 e pH=4,5 respectivamente; B e D, Determinação dos diferentes tipos de fibras musculares nos cortes (60µm).

4.1.1.4. Testes biomecânicos

Dentro desta câmara, que faz parte do ergômetro (Figura 6 e 7) o músculo é montado horizontalmente, com a parte proximal fixada a um captor de força e sua extremidade distal foi ligada a parte móvel do ergômetro (vibrador eletromagnético).

Este sistema permite impor ao músculo estiramentos e relaxamentos de amplitude e velocidade controladas a um determinado momento da contração tetânica. Um estímulo tetanizante (25 volts e 80 Hz para o solear e 120Hz para o EDL) será liberado com duração determinada segundo o músculo avaliado, em intervalos de 5 min por dois eletrodos de prata em paralelo, colocados de cada lado do músculo dentro da câmara (Figura 6 e 7). Os pulsos serão supramáximos e com duração de 0,5 ms.

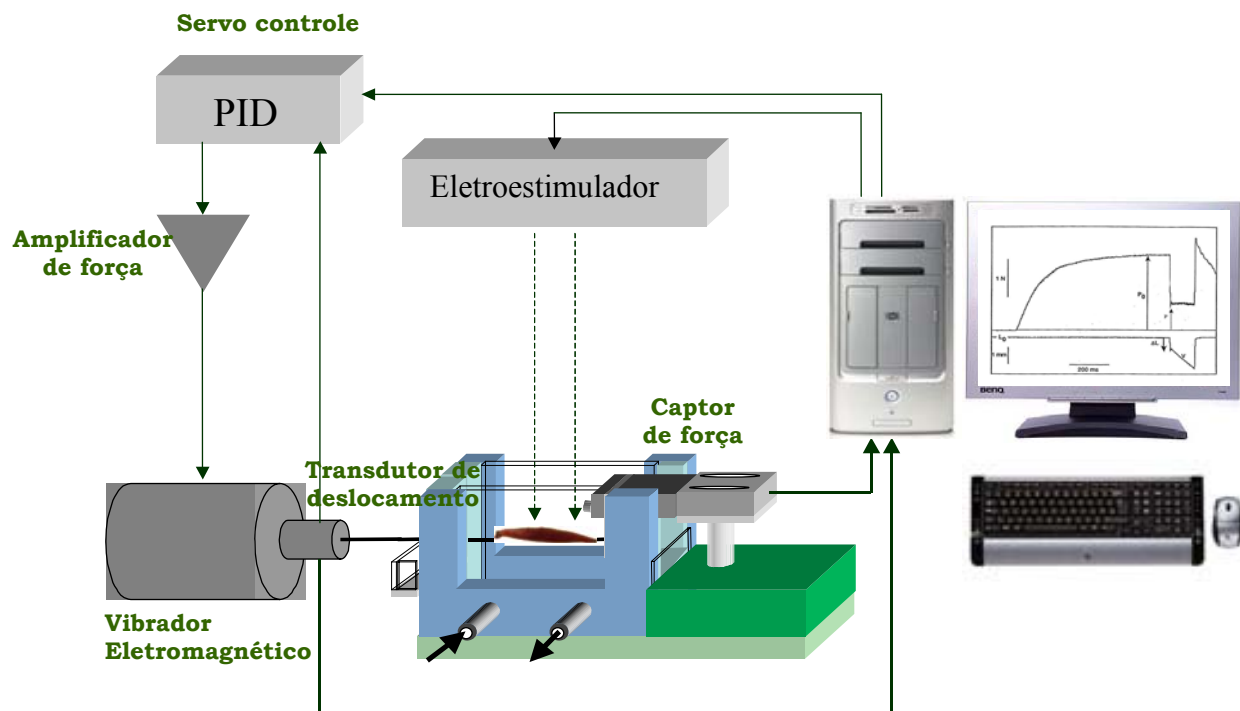


Figura 6. Representação esquemática do ergômetro.

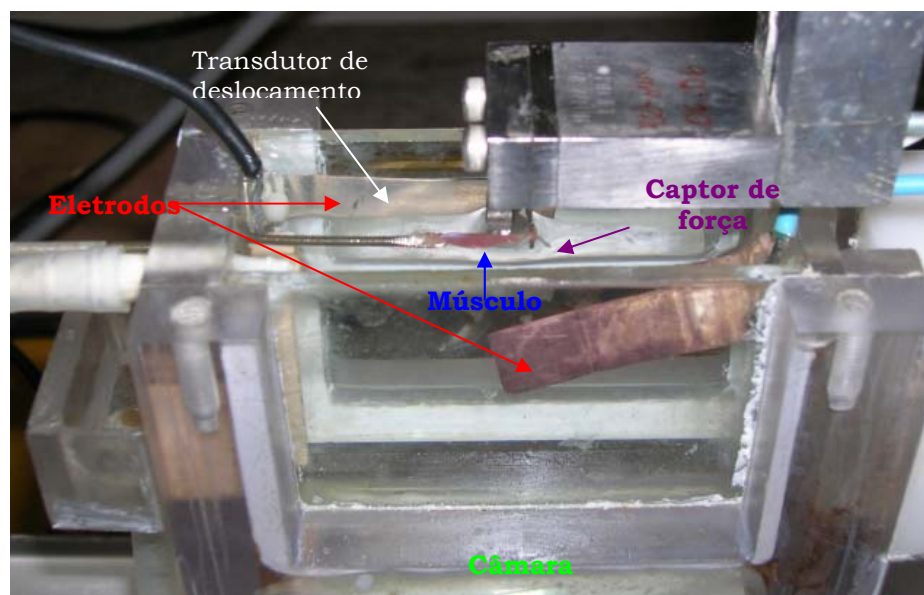


Figura 7. Músculo no interior da câmara do ergômetro para verificação das propriedades ativas do músculo.

O músculo é ajustado a um comprimento ótimo (L_0), definido como o comprimento no qual a força máxima do abalo muscular (P_t) será desenvolvida.

Características contráteis (CC) e elásticas em série (CES) foram avaliadas utilizando uma série de duplas liberações no comprimento imposto ao músculo, a partir de L_0 . O movimento do ergômetro é disparado quando a força tetânica (P_0) está completamente desenvolvida (800ms ou 300ms após o início da estimulação do solear ou EDL, respectivamente). Uma primeira liberação ocorre de forma rápida (30 cm.s^{-1}), ocasionando uma queda na força, sendo o valor mínimo de força P mensurado. Imediatamente após esta primeira liberação, o músculo é novamente encurtado numa velocidade (V) constante, ajustada de forma a se obter um platô na linha de registro da força que é desenvolvida (Figura 8).

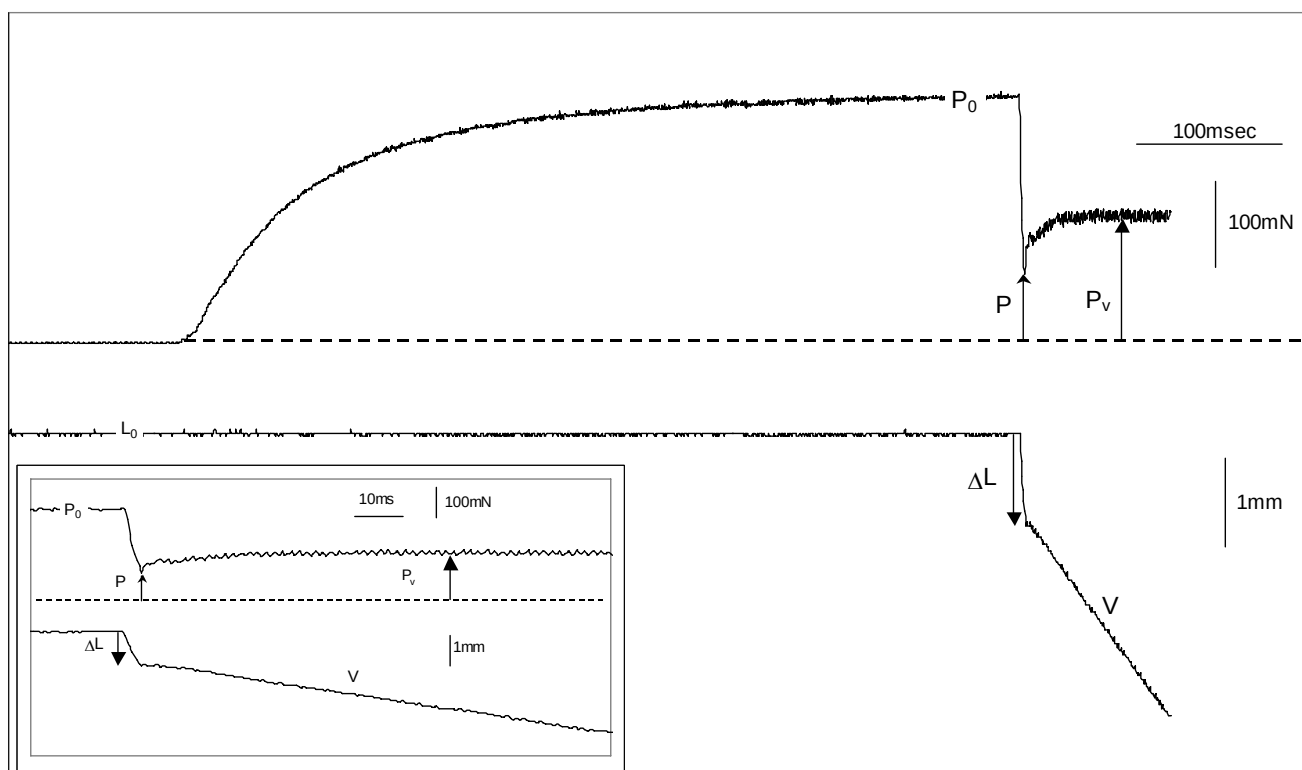


Figura 8: Registro típico da força obtida durante um teste de dupla liberação controlada.

Traço superior mostra mudanças da força. Traço inferior mostra mudanças impostas no comprimento.

Para testar a rigidez do CES, as curvas de força-extensão foram construídas a partir da variação de comprimento normalizado em relação ao L_0 ($\Delta L/L_0 \cdot 10^2$), versus a força relativizada (P/P_0), através de 10 a 15 liberações de diferentes amplitudes (Figuras 9). Os dados são inseridos em uma função polinomial de 3ª ordem e a rigidez do músculo será avaliada computando a relação ($\Delta l / \Delta P$) a uma P_0 e $0,2 P_0$ e a extensão máxima ($\Delta l \text{ max}$), isto é, a liberação mínima requerida para se obter uma tensão igual a zero.

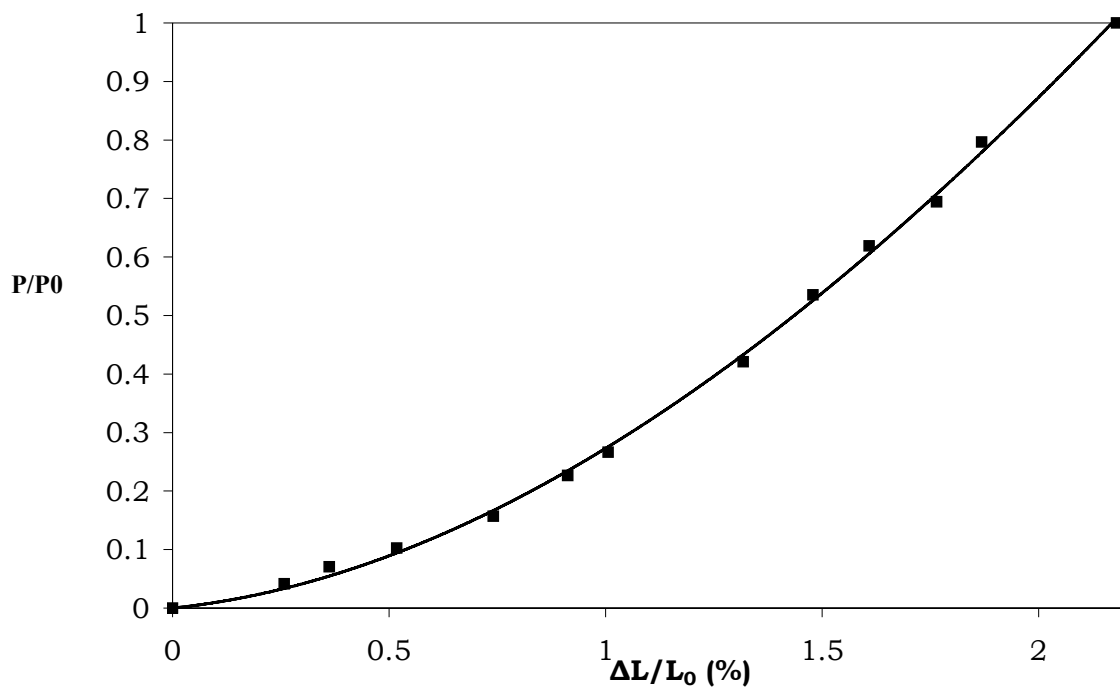


Figura 9. Exemplo típico de uma curva tensão-extensão característica do Componente Elástico em Série (CES) obtido a partir do método de “liberação controlada”.

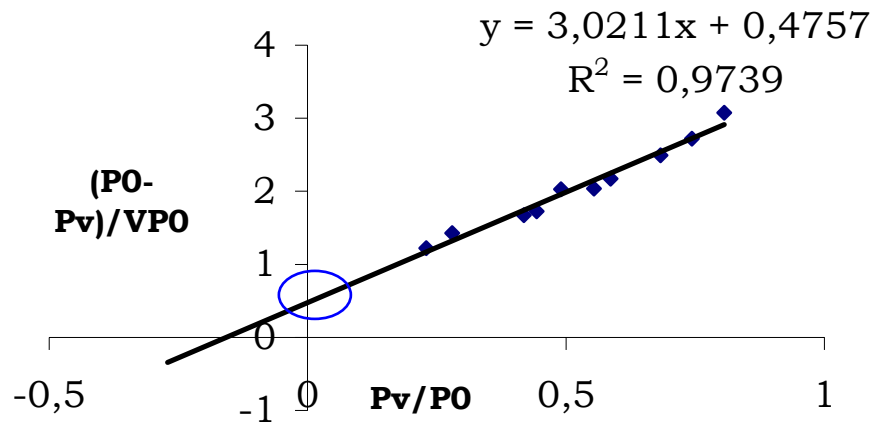


Figura 10: Relação velocidade-força típica linearizada. Ponto de intersecção (círculo azul) = Velocidade máxima de encurtamento (V_{max}).

A área sob a curva, que representa a energia potencial máxima armazenável no CES, foi também calculada (Figura 9). De acordo com a equação de Hill (1938), $[(P_v + a)(V + b) = (P_0 + a)b]$, uma linearização da curva velocidade-força será desenvolvida colocando para cada isovelocidade de encurtamento (V) a força normalizada (P_v/P_0), versus a proporção $(P_0 - P_v)/V \cdot P_0$. Os dados foram inseridos em uma função linear e a velocidade máxima de encurtamento (V_{max}) foi computada utilizando análise de regressão (Figura 10).

As medidas das características contráteis do músculo também incluem a análise do tempo de contração (CT), do tempo de meio-relaxamento (HRT) e da força obtida (P_t) durante o abalo (Figura 11).

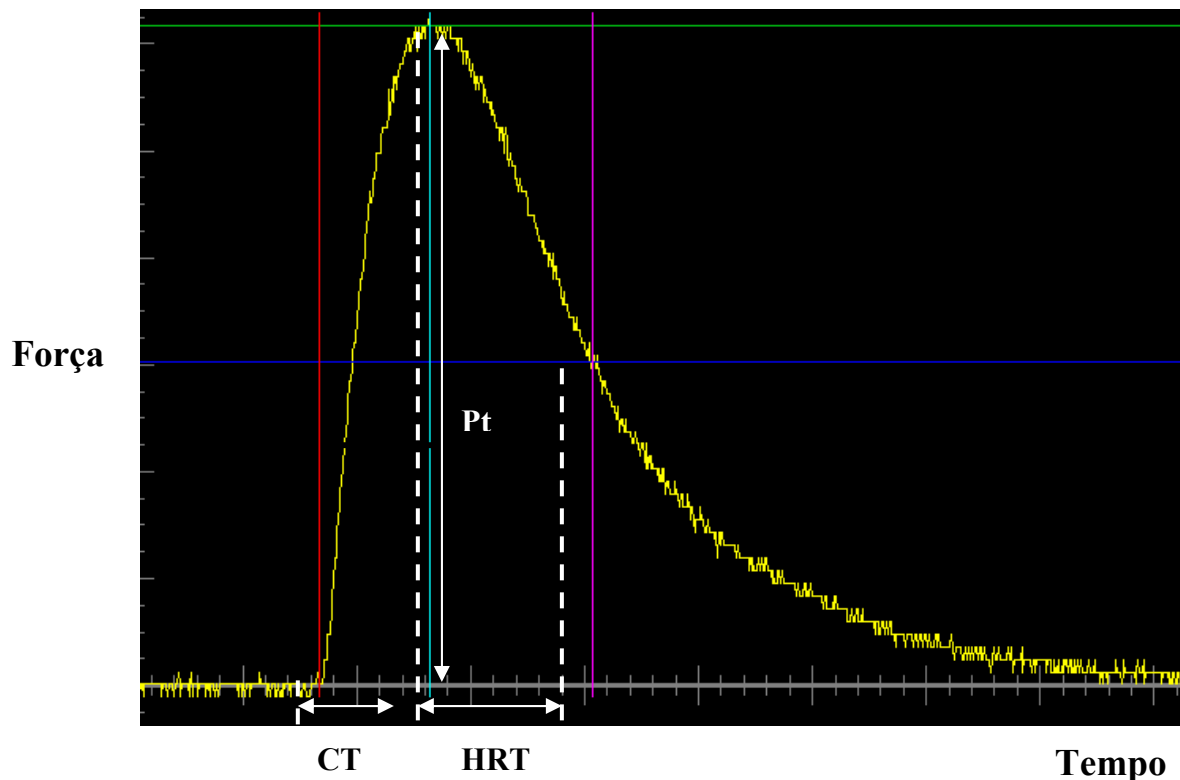


Figura 11: Registro típico de um abalo muscular (CT: tempo de contração; HRT, tempo de meio-relaxamento; Pt, força desenvolvida).

Para o teste de Fadiga muscular, pulsos com frequência de 40Hz e 330ms de duração foram aplicados durante dois minutos, sendo um pulso a cada segundo. O índice de resistência foi calculado como a tensão produzida a cada 30 segundos (ou seja, 30, 60, 90 e 120 segundos após o início do teste), dividida pela tensão produzida durante o primeiro segundo. O teste de fadiga foi realizado através de um protocolo semelhante ao descrito por Burke (1973).

Para análise do componente elástico em paralelo (CEP), o músculo foi colocado sob as mesmas condições anteriormente citadas, com sua parte proximal fixada a um captor de força e sua extremidade distal ligada à parte móvel de um ergômetro servo controlado (Lenseil-Corbeil e Goubel, 1989). As análises do CEP ocorriam sem estimulação elétrica, para tanto os eletrodos de prata foram removidos (Figura 6).

O músculo foi ajustado ao seu comprimento frouxo (em inglês “slack”) (L_s), para testes no estado passivo, no qual uma tensão de repouso de 10mN foi obtida. O músculo foi submetido a três testes, teste de relaxamento incremental gradativo, teste de estiramento-relaxamento numa velocidade lenta e teste de relaxamento. Para cada teste, três testes foram desenvolvidos, os dois primeiros testes foram usados para pré-condicionar o músculo e o terceiro serviu para as análises de dados.

O primeiro teste foi o teste de relaxamento incremental gradativo, o músculo foi submetido a quatro extensões sucessivas graduais, impostas inicialmente a partir do L_s . Cada extensão consistia de uma extensão de 5% L_s numa velocidade rápida (500mm s^{-1}) e mantida nessa extensão durante 80s a fim de observar a queda da força em direção ao valor de platô. No final da quarta extensão gradual, o músculo foi rapidamente liberado para o valor de L_s . Esse teste nos permite medir, para cada extensão gradual, o valor do pico de força (F_d) a qual corresponde a força máxima desenvolvida pelo músculo no final do estiramento rápido e força estática (F_s) no final do platô de estiramento (Figura 12). F_d e F_s foram divididos pela área de secção transversa fisiológica do músculo (PCSA), que resulta na expressão do pico e tensão (σ_d) e a tensão estática (σ_s). PCSA do músculo foi calculada através da equação $\text{PCSA} = \text{PM}/(\text{Lm} \cdot 1.06 \cdot \text{Lf}/\text{Lm})$ onde PM é o peso muscular, Lm é o comprimento muscular, 1,06 é a densidade muscular (g.cm^{-3}), e Lf/Lm é a razão entre o comprimento da fibra e o comprimento muscular e corresponde a 0,72 e 0,44 para o músculo solear e EDL, respectivamente (Ranatunga et al, 1982, Gregorevic et al, 2002).

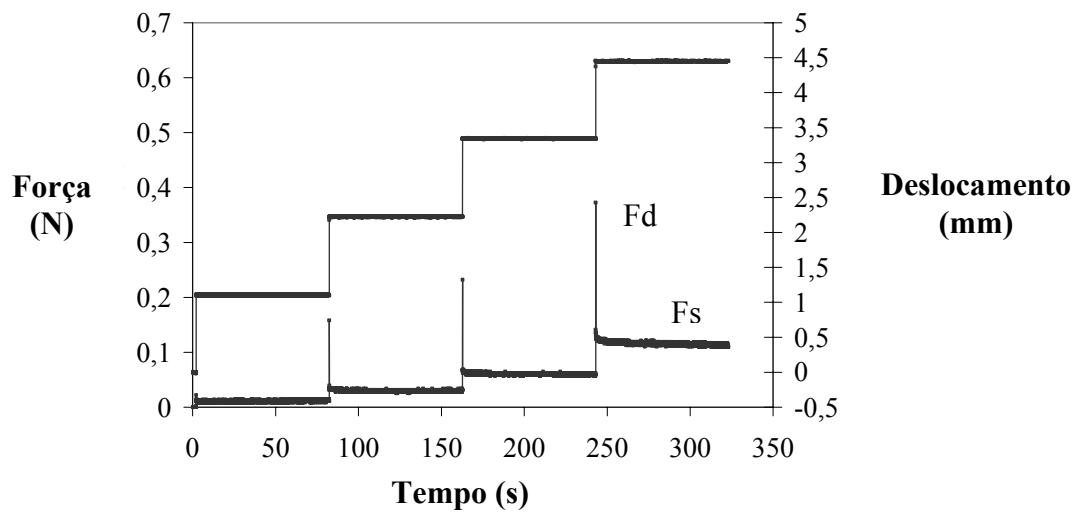


Figure 12: Registro típico obtido durante um teste de relaxamento incremental. O traçado superior mostra as modificações impostas no comprimento. O traçado inferior mostra as modificações da força. (Fd, pico de força; Fs, força estática).

O segundo teste, o teste de estiramento-relaxamento, consistia no estiramento do músculo a amplitudes superiores a 125% do Ls com velocidade lenta (0,1 mm/s) seguido pelo relaxamento até o Ls com a mesma velocidade (Figure 13). Desses dados, a tensão (i.e. força passiva normalizada em relação a PCSA) e tração (em inglês “strain”) (i.e. deformação/Ls) foi calculada a fim de construir a curva tensão-tração. Dessa curva, a resistência a 125%Ls e o módulo tangencial foi calculado. O módulo tangencial foi determinado calculando a inclinação da reta da parte linear da relação durante a extensão (Figura 13).

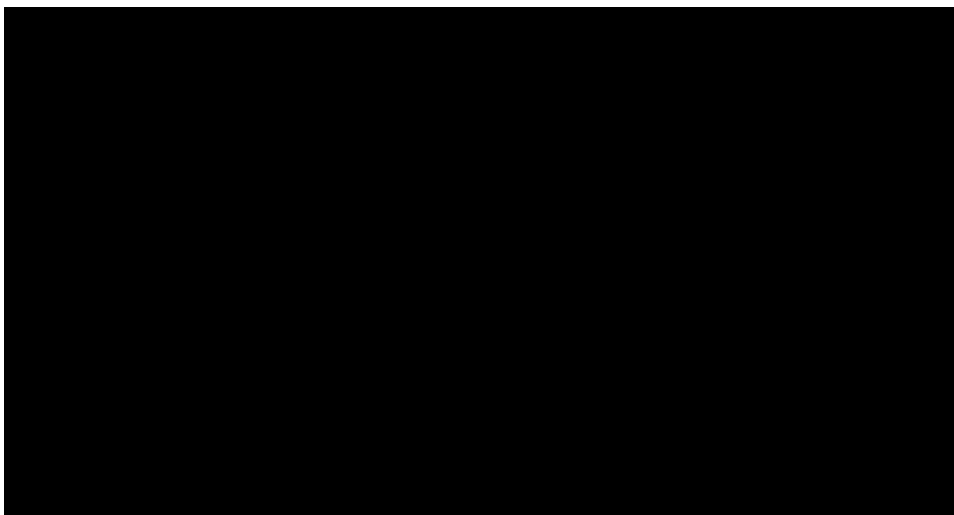


Figura 13. Relação tensão-tração obtida a partir de um teste de estiramento à velocidade lenta.

O terceiro teste realizado foi o teste de relaxamento que consistia no estiramento do músculo a 15% do L_s (ΔL) em diferentes velocidades durante 80s. Inicialmente utilizava-se uma velocidade 1 L_s/s , em seguida, 2 L_s/s , 5 L_s/s , 10 L_s/s , 15 L_s/s , 20 L_s/s e 30 L_s/s . Esse teste realiza uma evolução não monótona da força passiva no momento da fase de estiramento com um ponto de pausa dependente da velocidade de estiramento.

Nesse teste foram mensurados a **Fd** (pico de força) desenvolvido no final do estiramento rápido e **Fs** (força estática) desenvolvida no final da fase estática (figura 14 e 15).

Na figura 14, pode-se observar também P_1 , tensão nos pontos de pausa, determinada como a tensão no ponto de pausa entre duas distâncias lineares (montado na fase de elevação em ambos os lados da pausa). A força P_1 aumenta em proporção direta a velocidade de estiramento, caracterizando-se como uma resposta viscosa (Mutungi e Ranatunga, 1996) (Figura 14).

A força P_2 , por sua vez, foi calculada subtraindo-se as forças $P_1 + F_s$ de F_d . Sugere-se que F_s caracteriza-se como uma resposta elástica (Mutungi e Ranatunga, 1996) (figura 14 e

15). A equação montada para P2 (resposta viscoelástica) versus a duração do estiramento foi (Bagni et al., 1995):

$$P2 = l k t_r / t_d (1 - \exp(-t_d / t_r)),$$

Essa equação descreve a dependência da resposta da força de um sistema viscoelástico (um elemento viscoso em série com um elemento elástico) sobre a duração do estiramento ($1/t_d$). l é a amplitude do estiramento, k , é a rigidez, t_r é o tempo de relaxamento e t_d é a duração do estiramento. O t_d calculado a partir da razão ΔL /velocidade aplicada em cada teste. Uma vez que a amplitude de estiramento em rampa foi constante em determinadas series, $1/t_d$ foi diretamente proporcional a velocidade de estiramento, uma equação semelhante pode ser usada para P2 versus a velocidade de estiramento (Bagni et al., 1995). A partir dos pontos de P_1 nas diferentes velocidades estudadas, estabeleceu-se uma reta de regressão e foi calculado o coeficiente de viscoso, h (figura 14 e 15). O coeficiente de viscoso foi expresso como força (por unidade de área) dividida pela velocidade de estiramento (expressa em Ls^{-1}) (Bagni et al., 1999).

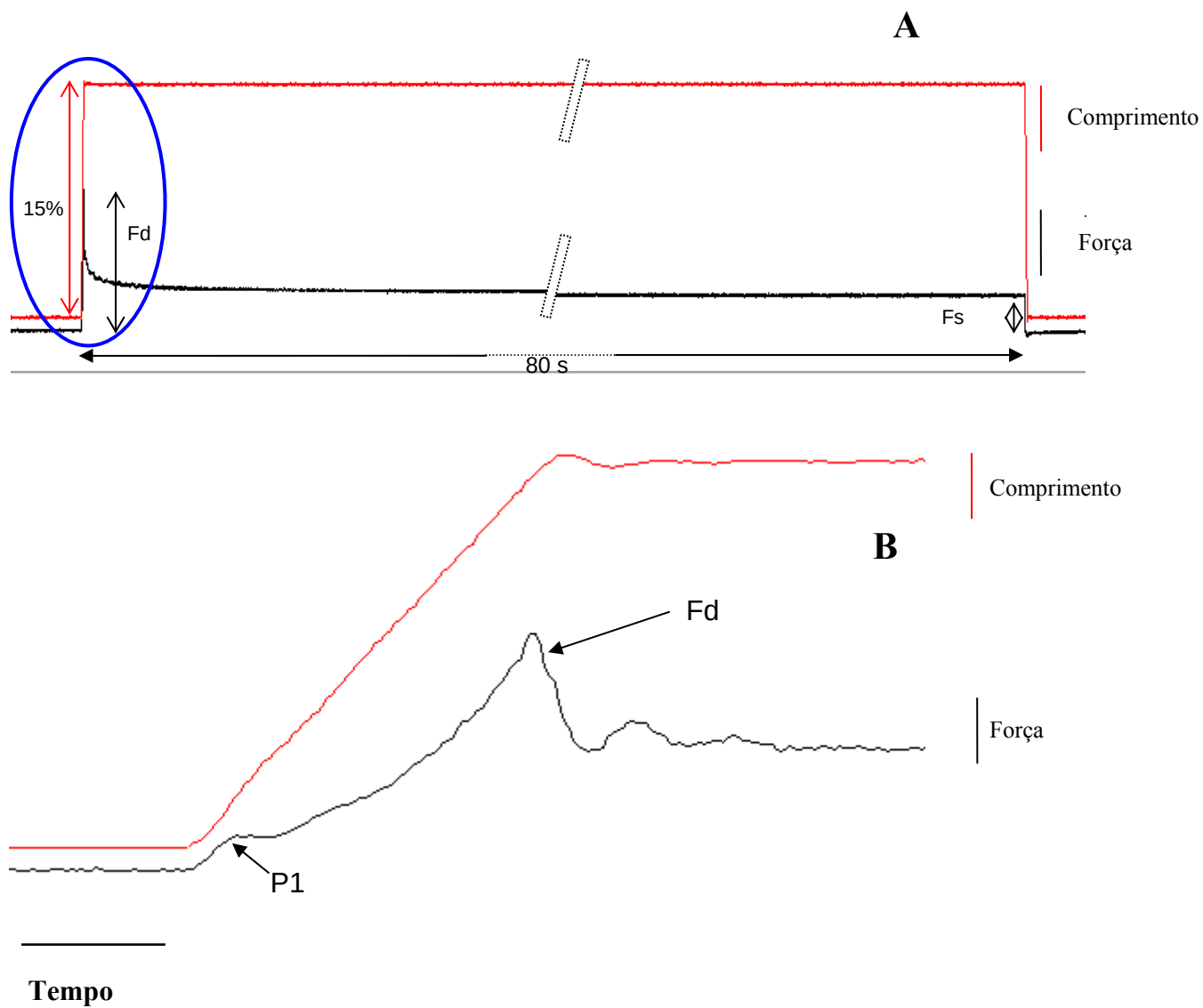


Figure 14: A e B, Registro típico obtido durante o teste de relaxamento. F_d , Pico de força, F_s , força estática, P1, tensão nos pontos de pausa.

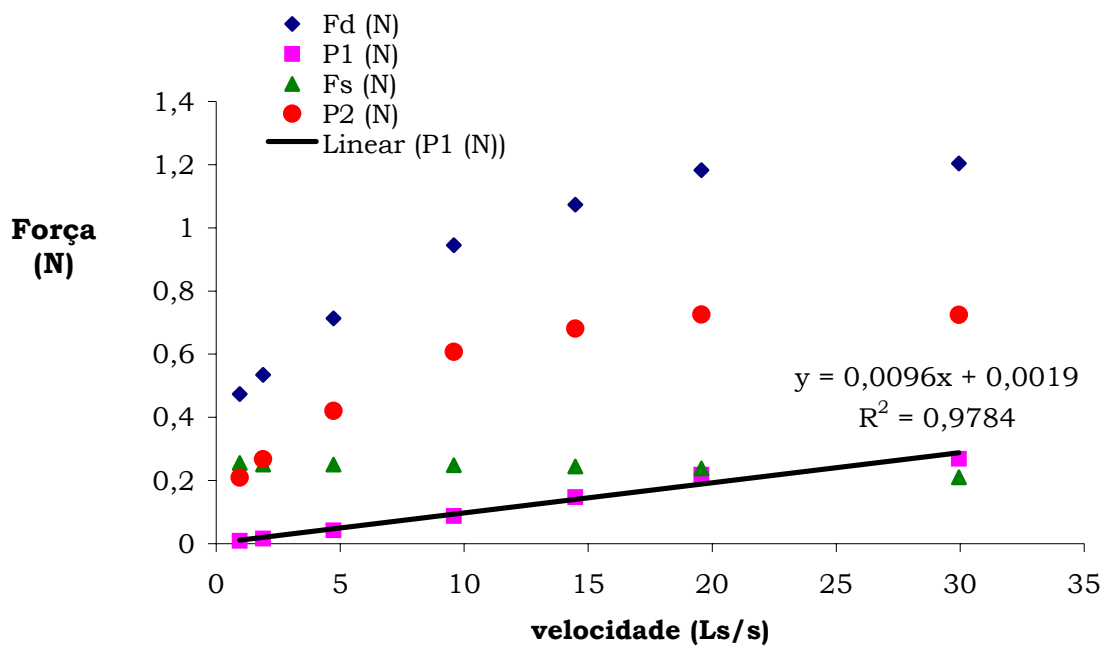


Figure 15: Relação em função da velocidade de estiramento, dos valores de força das respostas viscosas (P1), visco-elástica (P2) e elástica (Fs), assim como do pico de força (Fd) durante o teste de relaxamento.

4.1.2. Análise dos Resultados

Os dados foram analisados através do software Sigmastat 3.0. Uma Análise de Variância Two-way foi realizada para avaliar a influência da idade e do estado nutricional no peso corporal. Uma Análise de Variância Three-way foi realizada para avaliar a influência da idade, do tipo de músculo e do estado nutricional nos demais parâmetros estudados. Em caso de diferença significativa, uma análise post hoc foi realizada através do teste de comparações múltiplas, assumindo um nível de 95% para admitir uma diferença estatística.

Peso corporal e muscular

Mães desnutridas mostraram menor peso corporal (g) aos 16 dias de vida ($C=367,5 \pm 8,1g$; $D=344,7 \pm 6,7g$), e aos 21 dias de gestação quando comparadas ao grupo controle ($C=431,6 \pm 7,6g$; $D=380,7 \pm 13,4g$) (Figura 16A). Ao nascimento, no 14º, 25º e 90º dia de vida, filhotes de mães desnutridas mostraram menor peso corporal que os animais do grupo controle (Figura 16B).

Os músculos solear e EDL apresentaram-se menores nos filhotes de mães desnutridas aos 25º e 90º dias de vida quando comparados ao controle (solear aos 25 dias, $C=49,6 \pm 1,43mg$; $D=27,0 \pm 2,6mg$; solear aos 90 dias, $C=243,0 \pm 11mg$; $D=199,0 \pm 7,0mg$; EDL aos 25 dias, $C=46,1 \pm 2,9mg$; $D=24,9 \pm 2,6mg$; EDL aos 90 dias $C=237,0 \pm 3,2mg$; $D=184,0 \pm 6,4mg$) (Figure 17A, 17B). A relação peso muscular/peso corporal do animal mostrou-se menor no solear do grupo D aos 25 dias ($C=0,51 \pm 0,02$; $D=0,39 \pm 0,02$), mas não aos 90 dias de vida ($C=0,52 \pm 0,03$; $D=0,52 \pm 0,02$, $p>0.05$) (Figure 17C). Os músculos EDL foram menores em ambas as idades nos filhotes de mães desnutridas (Figure 17D). A secção transversa fisiológica do músculo também foi menor no grupo Desnutrido em relação ao grupo Controle aos 25 e 90 dias de vida no músculo EDL (EDL aos 25 dias, $C=4,76 \pm 2,9mm^2$; $D=2,89 \pm 0,13mm^2$; EDL aos 90 dias $C=15,12 \pm 0,38mm^2$; $D=13,35 \pm 0,56mm^2$). No solear houve redução da área de secção transversa apenas aos 25 dias de vida (solear aos 25 dias, $C=3,49 \pm 0,18mm^2$; $D=2,01 \pm 0,13mm^2$; solear aos 90 dias, $C=11,00 \pm 0,36mm^2$; $D=11,46 \pm 0,74mm^2$).

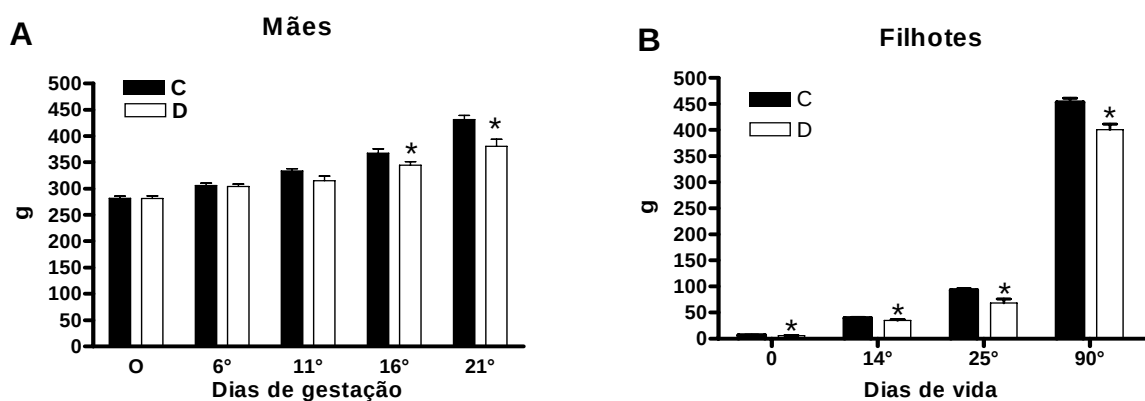


Figure 16. Média $\pm$ E.P.M. do peso corporal (g) de ratas as durante a gestação (A, n=22) e seus filhotes em diferentes idades (B, n=16). C, grupo controle e D, grupo desnutrido. * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

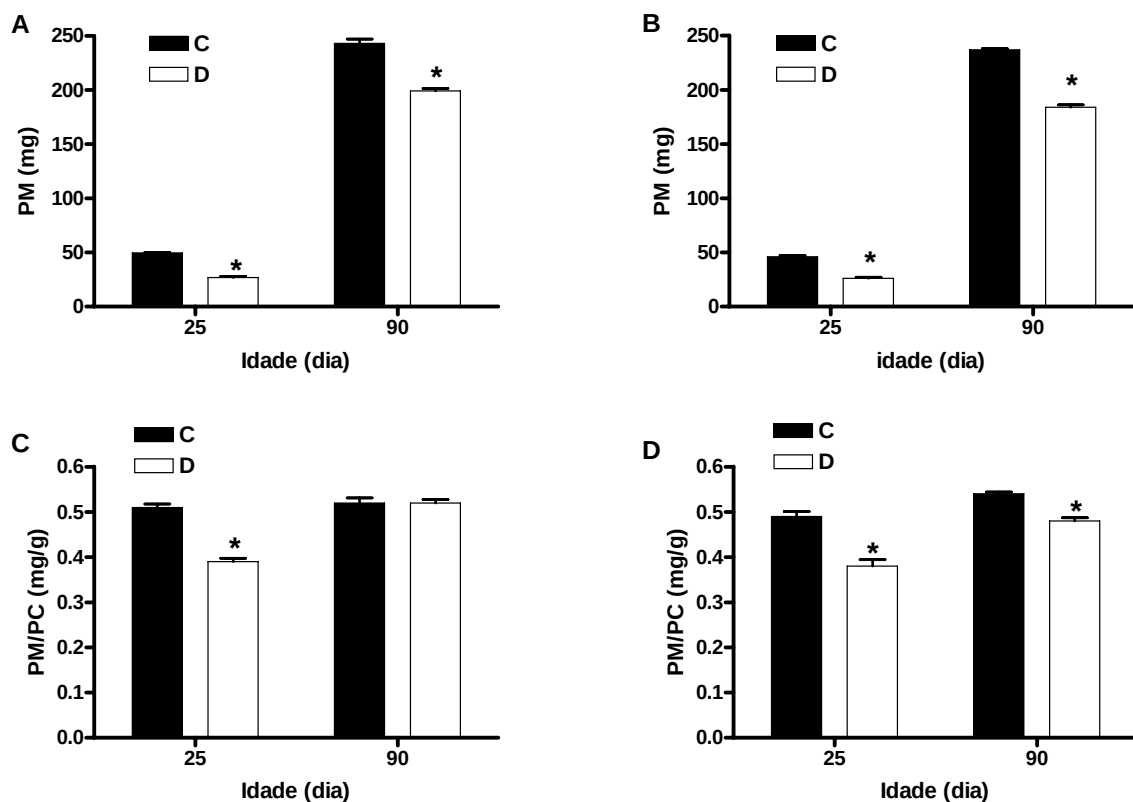


Figure 17. Média $\pm$ E.P.M. do peso muscular absoluto (PM) do solear (A, n=36) e EDL (B, n=33). Peso muscular relativo (PM/PC) do solear (C, n=36) e EDL (D, n=33). C, grupo controle; D, grupo desnutrido. * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

Análise histológica muscular

Aos 25 dias de vida, ratos desnutridos mostraram aumento na proporção de fibras tipo IIa ($C=27,1\% \pm 1,3$; $D=32,5\% \pm 2,1$) e das fibras intermediárias ($C= 4,7\% \pm 0,6$; $D= 8,6\% \pm 1,7$) no músculo solear ($p<0.05$). Aos 90 dias de idade, a proporção de fibras IIa permaneceu aumentada nos ratos desnutridos ($C=10,2\% \pm 1,3$; $D=19,7\% \pm 2,1$) (Figure 18A). Por outro lado, nos músculos EDL, houve diminuição na proporção de fibras tipo IIa e aumento nas fibras tipo IIb aos 25 e 90 dias de vida nos animais desnutridos quando comparados aos do grupo controle (Figura 18B).

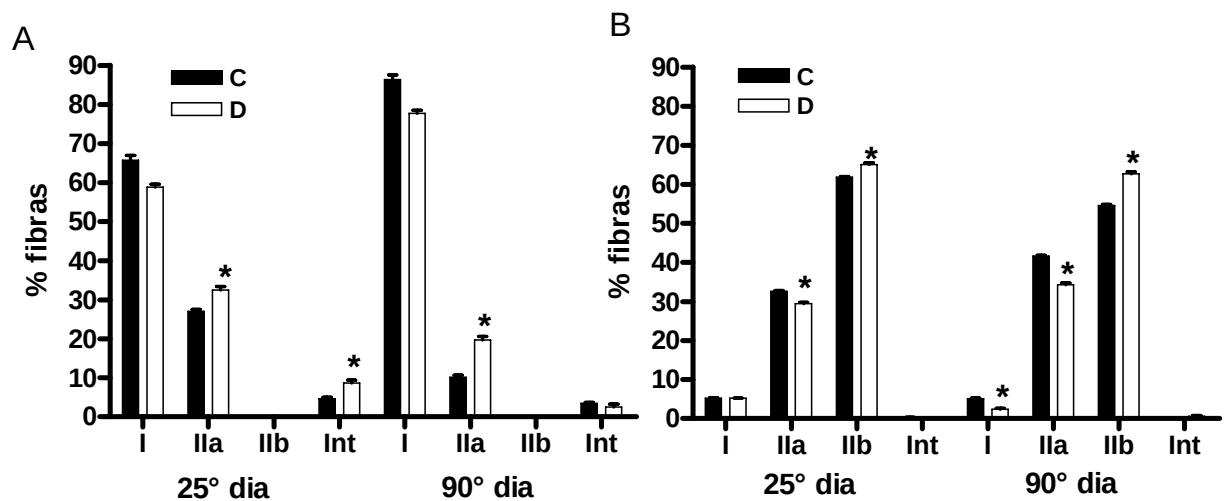


Figure 18. Proporção dos diferentes tipos de fibras dos músculos solear (A, $n=22$) e EDL (B, $n=17$) aos 25 e 90 dias de vida. C, grupo controle; D, grupo desnutrido. * $p<0.05$ controle vs desnutrido.

Análise das propriedades mecânicas musculares

Componente Contrátil (CC)

Aos 25 dias de vida, os filhotes submetidos à desnutrição gestacional mostraram diminuição na força máxima durante o abalo muscular (P_t) e na força tetânica (P_0) e aumento na força tetânica relativa (P_0/PM) e na velocidade máxima de encurtamento (V_{max}) em ambos os músculos solear e EDL (Tabela 2). No entanto, aos 90 dias de vida, P_0/PM e V_{max} permanecem aumentados no músculo solear (Tabela 2). Por outro lado, o músculo EDL de ratos desnutridos permanece com todas as mudanças nas propriedades contráteis como visto aos 25 dias de vida (Tabela 2). Não houve diferença no tempo de contração (CT) e no tempo de meio relaxamento (HRT) quando os grupos foram comparados nas diferentes idades (Tabela 2).

Tabela 2. Média $\pm$ E.P.M. da força máxima durante o abalo muscular (Pt), força tetânica (P_0), força tetânica relativa (P_0/PM), tempo de contração (CT), tempo de meio-relaxamento (HRT) e velocidade máxima de encurtamento (V_{max}). C, grupo controle; D, grupo desnutrido.

		Pt	P_0	P_0/MW	CT	HRT	V_{max}
		(mN)	(mN)	(mN/mg)	(ms)	(ms)	(L0/s)
<i>Solear</i>							
	25° dia						
	C, n=8	90,9 $\pm$ 5,2	456,9 $\pm$ 21,1	9,09 $\pm$ 0,2	45,7 $\pm$ 1,8	75,7 $\pm$ 3,6	2,3 $\pm$ 0,1
	D, n=11	62,6 $\pm$ 3,9*	290,1 $\pm$ 25,8*	11,0 $\pm$ 0,6*	46,6 $\pm$ 2,6	87,3 $\pm$ 5,5	2,9 $\pm$ 0,4*
	90° dia						
	C, n=9	293,3 $\pm$ 15,3	1931,8 $\pm$ 78,2	8,0 $\pm$ 0,3	55,1 $\pm$ 2,0	114,8 $\pm$ 5,6	1,4 $\pm$ 0,1
	D, n=8	279,6 $\pm$ 14,1	1932,6 $\pm$ 76,5	9,82 $\pm$ 0,4*	54,7 $\pm$ 2,0	108,8 $\pm$ 4,0	2,2 $\pm$ 0,3*
<i>EDL</i>							
	25° dia						
	C, n=9	176,3 $\pm$ 10,7	577,4 $\pm$ 22,4	12,8 $\pm$ 0,8	19,8 $\pm$ 0,5	28,6 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,2
	D, n=8	142,8 $\pm$ 10,3*	465,0 $\pm$ 20,2*	19,8 $\pm$ 1,9*	18,3 $\pm$ 0,7	31,3 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 0,2*
	90° dia						
	C, n=8	1035,6 $\pm$ 26,3	3661,5 $\pm$ 108,8	15,5 $\pm$ 0,5	18,3 $\pm$ 1,0	24,6 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 0,1
	D, n=8	847,7 $\pm$ 36,7*	3214,5 $\pm$ 80,2*	17,5 $\pm$ 0,5*	17,5 $\pm$ 0,2	22,4 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,3*

* p<0.05 controle vs desnutrido.

Análise do teste de fadiga

A análise do teste de fadiga não revelou diferenças estatisticamente significantes nos grupos analisados (Tabela 3).

Tabela 3: Média $\pm$ E.P.M. do índice de resistência à fadiga (IF) aos 30, 60, 90 e 120 segundos de teste no músculo solear e EDL de ratos Controle (C) ou Desnutrido (D) aos 25 e 90 dias de vida.

		IF30s	IF60s	IF90s	IF120s
<i>Solear</i>					
	25° dia				
	C, n=6	0,65 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,05
	D, n=6	0,59 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,06
	90° dia				
	C, n=5	0,84 $\pm$ 0,09	0,67 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,08
	D, n=6	0,82 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03
<i>EDL</i>					
	25° dia				
	C, n=5	0,69 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,02
	D, n=4	0,70 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,05
	90° dia				
	C, n=6	0,94 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
	D, n=5	0,84 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01

Componente Elástico em Série (CES)

Aos 90 dias de vida, foi encontrado um ligeiro aumento não significativo da complacência do CES entre os grupos C e D para os músculos solear e EDL (Tabela 4). Em contraste, nos animais aos 25 dias de vida, houve diminuição na complacência em $0,2 P_0$ e na extensibilidade máxima no músculo solear aos 25 dias de vida de filhotes desnutridos durante a gestação (Tabela 4), enquanto que no músculo EDL de ratos desnutridos houve aumento nessas propriedades (Tabela 4).

Tabela 4. Média $\pm$ E.P.M. das propriedades elásticas em série dos músculos solear e EDL. C, grupo controle; D, grupo desnutrido.

	Complacência a P_0 ($L_0/P_0 \cdot 10^2$)	Complacência a $0.2P_0$ [(L_0/P_0). 10^2]	Area ($\Delta L/L_0$).(P/P_0). 10^4	Extensão Máxima ($\%L_0$). 10^2
Solear				
25° dia				
C , n=8	1,16 $\pm$ 0,1	2,71 $\pm$ 0,1	78,46 $\pm$ 2,1	2,27 $\pm$ 0,1
D , n=11	1,03 $\pm$ 0,1	2,47 $\pm$ 0,1*	70,9 $\pm$ 1,2	2,06 $\pm$ 0,1*
90° dia				
C , n=8	1,14 $\pm$ 0,1	2,25 $\pm$ 0,2	75,62 $\pm$ 3,8	1,90 $\pm$ 0,1
D , n=8	1,22 $\pm$ 0,1	2,40 $\pm$ 0,1	76,93 $\pm$ 4,4	2,01 $\pm$ 0,1
EDL				
25° dia				
C , n=9	1,25 $\pm$ 0,1	2,72 $\pm$ 0,1	82,40 $\pm$ 1,9	2,34 $\pm$ 0,1
D , n=8	1,34 $\pm$ 0,1	3,33 $\pm$ 0,1*	94,22 $\pm$ 4,7	2,75 $\pm$ 0,1*
90° dia				
C , n=8	1,40 $\pm$ 0,1	2,26 $\pm$ 0,2	82,08 $\pm$ 4,4	2,08 $\pm$ 0,2
D , n=8	1,38 $\pm$ 0,1	2,43 $\pm$ 0,1	81,66 $\pm$ 1,0	2,19 $\pm$ 0,1

*p<0.05 controle vs desnutrido.

Teste de relaxamento incremental gradativo

Ao desmame, os animais mostraram aumento na resistência ao estiramento passivo para cada extensão em ambos os músculos solear e EDL (Figura 19I, 19II, 19V e 19VI). No músculo solear aos 25 dias de idade, a desnutrição levou ao aumento no pico de tensão de 40%, 48%, 57% e 52% para o primeiro, segundo, terceiro e quarto aumento, respectivamente (19I). Aumentos na mesma ordem foram obtidos pelo músculo EDL (19V). Além disso, a desnutrição levou ao aumento na tensão estática de cerca de 65% no solear e de 100% no EDL (19II e 19VI).

Os efeitos da desnutrição sobre os aumentos no pico de tensão e na tensão estática não tiveram efeitos a longo-prazo. Não houve diferenças no solear e no EDL entre os grupos controle e desnutrido (19III, 19IV, 19VII e 19VIII).

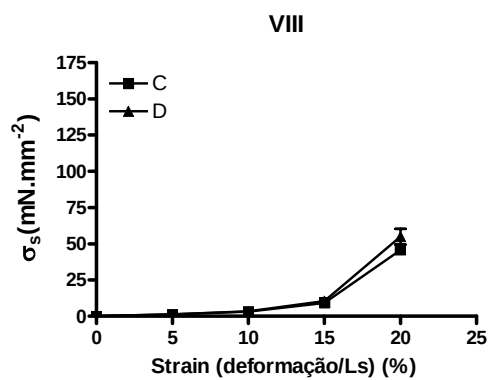
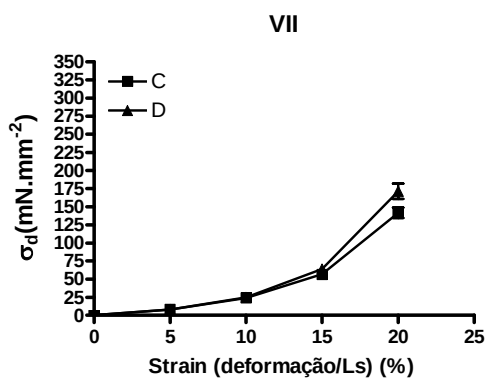
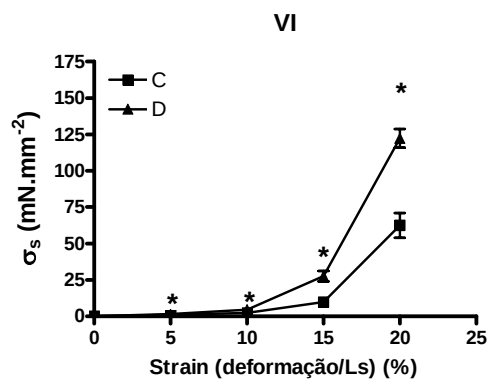
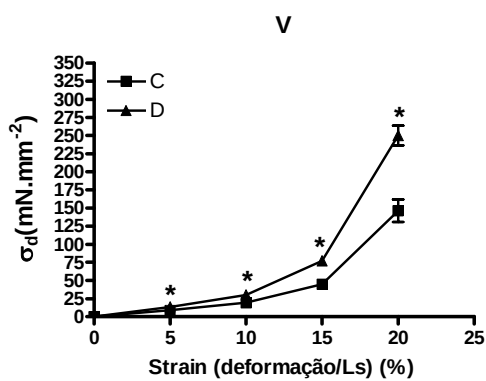
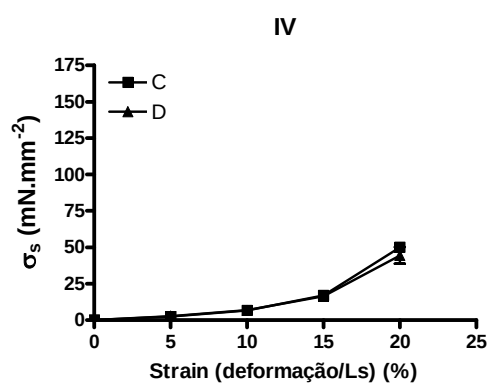
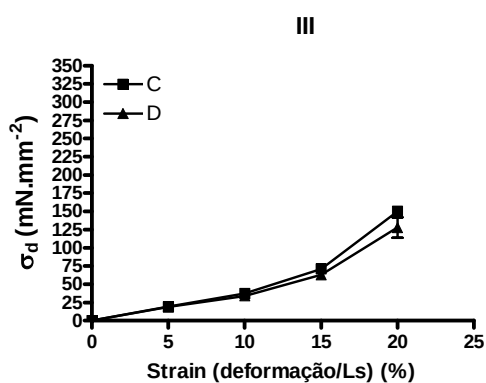
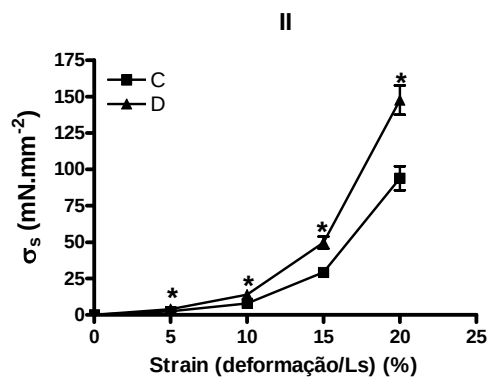
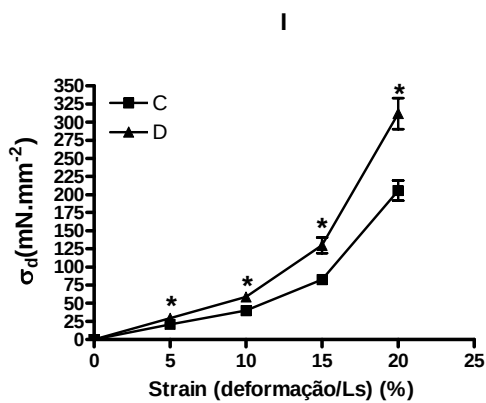


Figura 19: Média $\pm$ EPM do pico de tensão (σ_d) (I, III, V e VII) e da tensão estática (σ_s) (II, IV, VI, VIII) obtida para cada aumento de comprimento durante o teste de relaxamento incremental sobre o solear de 25 dias (I, II) e de 90 dias (III e IV) ou dos EDL de 25 dias (V e VI) e de 90 dias (VII e VIII). C, Grupo Controle (n=23); D, Grupo Desnutrido (n=27). * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

Teste estiramento-relaxamento

A força passiva desenvolvida a 25% de tração (deformação/Ls) não foi modificada em ambos os músculos solear e EDL de ratos desnutridos ao desmame e no adulto jovem em relação ao controle (Tabela 5). Quando a força passiva foi expressa em termos como tensão (i.e. força dividida pelo PCSA), parece que a desnutrição intra-uterina levou ao aumento da tensão passiva em ambos os músculos solear e EDL em ratos aos 25 dias de vida pós-natal (Tabela 5). Esse aumento na resistência ao estiramento passivo observado no solear e EDL do grupo D foi também confirmado pelo aumento no módulo tangencial e na resistência normalizada (resistência/PCSA) (Tabela 5). No rato adulto jovem, não houve diferença nesses parâmetros entre os grupos em ambos os músculos solear e EDL (Tabela 5).

Tabela 5. Média $\pm$ EPM da Força, Força/PCSA, módulo tangencial e resistência normalizada nos animais controle e alimentados com dieta com baixa caloria ao desmame e na idade adulta. PCSA, área de secção transversa fisiológica. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido.

		Força (N)	Força/PCSA (N/mm ²)	Módulo tangencial (N/mm ²)	Resistência normalizada (N/mm ²)
Soleus					
	25° dia				
	C(n=5)	0.72 ± 0.06	0.22 ± 0.02	3.00 ± 0.34	0.87 ± 0.08
	D (n=8)	0.57 ± 0.02	0.30 ± 0.02*	3.67 ± 0.34*	1.19 ± 0.10*
	90° dia				
	C(n=6)	1.53 ± 0.09	0.14 ± 0.01	2.44 ± 0.22	0.56 ± 0.04
D(n=6)	1.30 ± 0.10	0.13 ± 0.01	2.29 ± 0.14	0.50 ± 0.06	
Edl	25° dia				
	C(n=6)	0.86 ± 0.07	0.19 ± 0.02	2.21 ± 0.32	0.76 ± 0.07
	D(n=6)	0.76 ± 0.09	0.27 ± 0.03*	4.03 ± 0.39*	1.07 ± 0.12*
	90° dia				
	C(n=6)	2.41 ± 0.23	0.15 ± 0.02	2.42 ± 0.39	0.62 ± 0.07
	D(n=5)	2.47 ± 0.14	0.20 ± 0.01	3.36 ± 0.44	0.80 ± 0.04

* p<0.05 controle vs desnutrido.

Teste de relaxamento

Na análise do componente elástico em paralelo a partir do teste de relaxamento, pode-se observar que as respostas viscosa, viscoelástica e elástica do músculos solear e EDL não sofreram alterações aos 90 dias de vida nos animais submetidos a dieta com baixo teor proteico durante a gestação em relação aos animais do grupo controle (Tabela 6). Embora, aos 25 dias de vida, tanto o solear quanto o EDL dos animais desnutridos mostraram aumento do coeficiente viscoso, h ; dos elementos relacionados a resposta viscoelástica, t_r e k (resistência ao estiramento passivo); da tensão estática (relacionado a resposta elástica dos músculos); e do pico de tensão (Tabela 6).

Tabela 6. Média $\pm$ E.P.M. da viscosidade (h), do tempo de relaxamento (t_r), rigidez (K), da tensão estática (Fs/PCSA) e da tensão dinâmica (Fd/PCSA) nos animais controles e alimentados com dieta com baixo teor proteico durante a gestação ao desmame e na idade adulta. PCSA, área de secção transversa muscular fisiológica. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido.

		h [mN.s. mm ⁻² . (Ls) ⁻¹].10 ⁻³	t_r (msec)	k (N/mm ²)	Fs/PCSA (N/mm ²)	Fd/PCSA (N/mm ²)
Solear						
	25 dias					
	N (n=5)	0,6239 $\pm$ 0,07	0,0654 $\pm$ 0,02	0,0713 $\pm$ 0,01	0,0271 $\pm$ 0,01	0,1102 $\pm$ 0,02
	D (n=7)	1,011 $\pm$ 0,06*	0,1014 $\pm$ 0,01*	0,1221 $\pm$ 0,01*	0,0608 $\pm$ 0,00*	0,1988 $\pm$ 0,01*
	90 dias					
	N (n=8)	0,9406 $\pm$ 0,05	0,0305 $\pm$ 0,00	0,0781 $\pm$ 0,01	0,0186 $\pm$ 0,00	0,1107 $\pm$ 0,00
	D (n=6)	0,9025 $\pm$ 0,10	0,0321 $\pm$ 0,01	0,0642 $\pm$ 0,01	0,0197 $\pm$ 0,00	0,1055 $\pm$ 0,01
EDL						
	25 dias					
	N (n=5)	0,5710 $\pm$ 0,10	0,0349 $\pm$ 0,01	0,1090 $\pm$ 0,01	0,0189 $\pm$ 0,00	0,1314 $\pm$ 0,01
	D (n=8)	0,7338 $\pm$ 0,05*	0,0399 $\pm$ 0,01*	0,1630 $\pm$ 0,01*	0,0513 $\pm$ 0,01*	0,2163 $\pm$ 0,01*
	90 dias					
	N (n=8)	0,8296 $\pm$ 0,07	0,0202 $\pm$ 0,00	0,1482 $\pm$ 0,01	0,0176 $\pm$ 0,00	0,1586 $\pm$ 0,01
	D (n=8)	1,0322 $\pm$ 0,09	0,0228 $\pm$ 0,00	0,1472 $\pm$ 0,01	0,0180 $\pm$ 0,00	0,1711 $\pm$ 0,01

* p<0.05 controle vs desnutrido.

4.1.6. Discussão

O modelo experimental de desnutrição durante a gestação, através do conteúdo reduzido de proteína é um instrumento útil para testar as mudanças no crescimento materno e fetal (Ozanne e Hales, 1999). No presente estudo, no último terço da gestação, ratas gestantes que se alimentaram com uma dieta com baixo teor protéico mostraram menor peso corporal comparadas àquelas ratas que se alimentaram com dieta controle. Similarmente aos nossos resultados, Snoeck e colaboradores (1990) verificaram redução no ganho de peso corporal em ratas gestantes submetidas a dieta com baixo teor de proteínas (8% de proteína/peso). Como foi referido em outros estudos (Ozanne e Hales, 1999; Snoeck et al., 1990; Almeida et al., 1996) a prole de mães desnutridas mostraram menor peso ao nascer. O mecanismo subjacente para esses efeitos deve estar relacionado ao metabolismo materno e ao ambiente endócrino, bem como ao fluxo sanguíneo uterino e umbilical e a transferência de nutrientes via placentária (Harding, 2001). Além disso, autores observaram que animais submetidos a desnutrição durante a lactação reduz o peso corporal sem modificar a ingesta alimentar (Lisboa et al., 2008). Segundo esses autores, isso pode ser devido ao estado hipermetabólico dos desnutridos associado ao prejuízo no crescimento (Lisboa et al., 2008). Dessa forma, a nutrição pode afetar o crescimento e o desenvolvimento fetal diretamente através da disponibilidade de nutrientes que serão distribuídos para o feto e possivelmente envolvendo parâmetros metabólicos como a glicose/insulina (Ozanne e Hales, 1999).

De fato, os tecidos sensíveis à insulina sofrem extensas mudanças em resposta à restrição protéica materna (Heywood et al., 2004; Albuquerque et al., 2006). Além disso, a programação da sensibilidade à insulina no músculo esquelético pode ocorrer durante a vida fetal (Ozanne et al., 1996). Nesse estudo, a desnutrição materna levou a atrofia no músculo solear e EDL dos filhotes a curto e em longo prazo. Zhu e colaboradores (2004) mostraram que restrição materna de nutrientes em carneiros diminui a síntese protéica sem alterações na degradação de proteínas no músculo esquelético fetal. O dano na síntese protéica pode acelerar a perda de massa muscular.

Conforme avaliado pela diminuição na razão peso muscular/peso corporal aos 25 dias de vida do animal, a atrofia não é apenas consequência do menor peso corporal, indicando um efeito mais importante da desnutrição intra-uterina sobre o músculo esquelético em relação a outros tecidos. Essa evidência é consistente com a hipótese que, durante a privação nutricional, o feto manterá o crescimento de tecidos nobres, tais como o cérebro, à custa de outros tecidos, como o músculo (Hales e Barker, 1992). Também a desnutrição afeta primariamente os tecidos sensíveis à insulina tais como o músculo esquelético (Heywood et al., 2004; Albuquerque et al., 2006). Por outro lado, o restabelecimento da dieta controle após o nascimento levou a um crescimento muscular relativo maior no animal desnutrido até 90 dias de vida pós-natal.

Não foi observado déficit na área de secção transversa do músculo solear de animais adultos submetidos à desnutrição durante a gestação no presente estudo. Ratos desnutridos durante a gestação e lactação mostraram déficit na área de secção das fibras do músculo solear e EDL aos 27 e 180 dias de vida (Bedi et al., 1982). Dados semelhantes foram encontrados também no músculo diafragma e no músculo tibial anterior após desnutrição durante a gestação (Prakash et al., 1993). Entretanto, no músculo solear e EDL de ratos aos 25 dias

houve redução da área de secção transversa e essa redução persistiu até os 90 dias de vida (idade adulta) no músculo EDL.

Filhotes de mães desnutridas mostraram maior proporção de fibras IIa no solear aos 25 e aos 90 dias de vida. Contrariamente, Howells e colaboradores (Howells et al., 1978) verificaram não haver modificações permanentes nas proporções dos tipos de fibras no solear de ratos desnutridos durante a gestação e lactação (mães foram submetidas à ingestão alimentar reduzida em 50% em relação à dieta controle *ad libitum*). Ratos desnutridos durante a gestação e o aleitamento (suas mães receberam uma quantidade de dieta balanceada que correspondia a aproximadamente metade da quantidade de dieta ingerida pelas mães controle *ad libitum*) foram alimentados normalmente durante 5 meses após esse período e não mostraram alterações no tamanho, no número e no tipo de fibras musculares do solear (Bedi et al., 1982). Modelos experimentais de indução da desnutrição bem como as diferentes idades em se realizaram os estudos podem justificar esses resultados opostos. No músculo EDL, há redução na proporção de fibras IIa e aumento nas fibras IIb aos 25 e 90 dias de vida. Similarmente aos nossos resultados, estudos prévios usando diferentes protocolos de indução da desnutrição encontraram alterações nas proporções de fibras tipo IIa e IIb (Howells et al., 1978; Zhu et al., 2006). Em músculos ricos em fibras de contração rápida, parece que tanto a quantidade de calorias na dieta quanto o conteúdo de proteínas durante o período crítico do desenvolvimento pode levar a consequências a longo-prazo (Howells et al., 1978; Bedi et al., 1982). O mecanismo subjacente poderia estar associado ao metabolismo específico desses músculos. A sensibilidade a insulina pelas fibras musculares é maior na fibra tipo I que na fibra tipo IIa (He et al., 2001). Uma vez que as fibras tipo IIb são menos dependentes a sinalização pela insulina (Nyholm et al., 1997), um aumento dessas fibras foi esperado. Esses dados reforçam a teoria de que o dano no desenvolvimento do músculo esquelético fetal como resultado da desnutrição materna predispõe o músculo esquelético da prole a resistência à

insulina. Por outro lado, hormônios tireoideanos são conhecidos por modular a expressão da miosina durante o desenvolvimento muscular (di Maso et al., 2000). A privação calórica nutricional precoce leva a mudanças no estado da tireóide (Shader et al., 1977; Passos et al., 2002; Lisboa et al., 2008). Autores referem diminuição no músculo da enzima 5-iodotironina deodinase tipo 2 (D2) responsável pelo metabolismo de T4 a T3 (Lisboa et al., 2008). A diminuição de D2 associado ao aumento de da enzima tipo 1 esta presente no hipertireoidismo (Bianco et al., 2002). Conseqüente a desnutrição, mudanças no estado da tireóide pode ser capaz de influenciar a proporção dos tipos de fibras durante o desenvolvimento muscular.

Uma diminuição na força tetânica e na força máxima do abalo muscular no solear e no EDL foi observada nos ratos desnutridos ao desmame. Entretanto, em ratos adultos, apenas o músculo EDL ainda mostrava diminuição na força tetânica e na força máxima do abalo muscular. Corroborando esses achados, um estudo anterior revelou que a desnutrição durante o período de aleitamento também reduz a força tetânica ao desmame no solear e no EDL e essa redução persiste no EDL até a idade adulta (Barros et al., 2004; Toscano et al., 2006). Isso levanta a possibilidade de que a restrição nutricional protéica severa, durante o período crítico do desenvolvimento, afeta a função muscular de força e possui conseqüências em longo prazo.

No presente estudo, a força tetânica relativa nos músculos solear e EDL estava aumentada nos filhotes desnutridos, perdurando até a idade adulta. O desenvolvimento da tensão no músculo isolado depende da secção fisiológica do músculo (i.e. área de secção transversa do músculo de acordo com o eixo perpendicular das fibras), do espaço interfibrilar e da proporção de tecidos conjuntivos. É improvável que um aumento de 20% na tensão relativa (esperado após esse tipo de agressão) pudesse ser devido somente ao aumento na secção fisiológica do músculo. Wank e colaboradores (2000) referem não haver alteração angular nas fibras musculares de músculos flexores plantares em cobaias neonatos desnutridos

durante a gestação. Bedi e colaboradores (1982) referem não haver aumento na proporção do volume de tecido conjuntivo dos músculos solear e EDL em ratos desnutridos durante gestação e aleitamento. Prakash e colaboradores (1993) mostraram diminuição no percentual do espaço intersticial no diafragma de ratos aos 21 dias de vida e em ratos adultos desnutridos durante o desenvolvimento fetal. Desse modo, uma diminuição do espaço interfibrilar devido à desnutrição pode ser parcialmente relacionada ao aumento na força tetânica relativa. Mudanças nas proporções dos diferentes tipos de fibras devem também ser consideradas conforme observado no presente estudo. Bottinelli e colaboradores (1991) referiram que a força por unidade de área de seção transversa foi menor em fibras lentas do que em fibras rápidas.

O tempo de contração e o tempo de meio-relaxamento estão relacionados à taxa de formação das pontes cruzadas entre a actina e miosina, fibra muscular e a liberação e recaptação do cálcio no retículo sarcoplasmático (Berchtold et al., 2000). No presente estudo, não houve alterações nos parâmetros da cinética do abalo muscular quando os grupos foram comparados. A falta de mudança na cinética do abalo muscular não é consistente com a mudança nos tipos de fibras como observado no presente estudo. No entanto, ao se estudar o músculo por inteiro, diferenças na duração do abalo muscular podem também resultar de mudanças nas propriedades elásticas em série (CES) (Hill, 1951). Nossos resultados mostram que a desnutrição materna aumenta a resistência dos CES no solear aos 25 dias de vida, embora mudanças contrárias fossem observadas no EDL, ou mesmo não houve mudanças significativas nos músculos do rato adulto. Assim, a influência das propriedades elásticas em série (CES) sobre a cinética do abalo muscular não podem explicar a ausência de mudanças no tempo de contração e no tempo de meio relaxamento. Finalmente, mudanças no movimento do cálcio do retículo sarcoplasmático poderia ser levado em conta. Conforme mencionado anteriormente, a privação protéica em ratos leva a modificação no estado da

tireóide, e essas mudanças no estado da tireóide causariam mudanças, tais como diminuição na concentração e atividade da Ca^{2+} ATPase (Arruda et al., 2005; Harrison et al., 1996). As mudanças na concentração e atividade da Ca^{2+} ATPase resultariam no atraso da cinética contrátil e dessa forma, se contrapor a aceleração da cinética do abalo muscular esperada pela transição de fibras lentas para fibras rápidas observada no presente estudo.

A desnutrição fetal não levou a alterações na resistência a fadiga no soleus e EDL aos 25 e 90 dias, esperada em virtude das modificações nas características tipológicas das fibras. De fato, admite-se que as unidades motoras do tipo I são resistentes a fadiga, contrariamente as unidades motoras do tipo IIa e IIb, as IIb são ainda mais fatigáveis (Burke et al., 1973). Além disso, essa inalteração da resistência a fadiga parece estar relacionada as modificações do metabolismo muscular oxidativo relacionado a desnutrição (White et al., 2000; Lefaucher et al., 2003).

A V_{max} é fortemente considerada uma função da miosina ATPase e correlações entre V_{max} e a percentagem de miosinas de cadeia pesada (MHC) rápidas tem sido relatado (Reiser et al., 1985). Além disso, mudanças na V_{max} são geralmente interpretadas em termos das alterações na distribuição da isoformas da miosina (Diffie et al., 1991). A desnutrição materna leva ao aumento na V_{max} nos músculos solear e EDL aos 25 dias de vida e na idade adulta. Em animais submetidos a desnutrição durante o período de aleitamento também foi observado aumento da V_{max} no solear e no EDL aos 25 dias de vida, a agressão no período neonatal não causou alterações na V_{max} na idade adulta (Barros et al., 2004; Toscano et al., 2006). Bottinelli e colaboradores (1991) mostraram uma V_{max} claramente reduzida em fibras tipo I do que em fibras rápidas, V_{max} médias menores em fibras do tipo IIa do que em fibras do tipo IIb. Dessa forma, no presente estudo, o efeito da desnutrição intra-uterina sobre a V_{max} é consistente com o aumento na proporção das fibras IIa no solear e das fibras IIb no músculo EDL.

Os elementos elásticos conectados em série com os componentes contráteis incluem ambas as estruturas passivas (i.e. estrutura tendinosa) e ativas (i.e. pontes cruzadas entre a actina e miosina) (Hill, 1951). Dessa forma, mudanças nas propriedades do componente elástico em série (CES) podem resultar de mudanças nessas duas estruturas. Bosco e colaboradores (1982) referem uma ligação entre as propriedades do CES e a composição dos tipos de fibras. Em modelos animais (como rato, por exemplo) que levam a adaptação dos tipos de fibras no músculo, o aumento na proporção das fibras lenta está associado ao aumento na resistência dos CES, embora a transição oposta do tipo de fibra seja acompanhada pela diminuição na resistência da CES (Goubel e Marini, 1987; Almeida-Silveira et al., 1994; Canon e Goubel, 1995; Canon et al., 1998). Nos animais aos 90 dias de vida, a privação nutricional fetal levou ao leve aumento não significante na complacência CES em ambos os músculos solear e EDL. Esse resultado poderia proceder do aumento na complacência da parte ativa do CES (devido à transição nos tipos de fibras observada nesses dois músculos) com simultâneo aumento na resistência de sua parte passiva. Por outro lado, nos ratos aos 25 dias de vida, a privação nutricional levou ao aumento na complacência CES no músculo EDL enquanto que no músculo solear houve mudanças opostas. Para o músculo EDL, pode ser hipotetizado que o aumento na complacência do SEC é devido em parte as mudanças no tipo de fibra. No músculo solear aos 25 dias de vida, a diminuição na complacência pela desnutrição resulta certamente em alterações opostas nas estruturas ativas e passivas do CES. A respeito de sua parte ativa, o músculo solear do rato desnutrido tem aumento na proporção de fibras rápidas. Semelhante aumento é encontrado no músculo solear utilizando-se técnicas de hiper e hipoatividade e está associado com o aumento na complacência muscular (Goubel e Marini, 1987; Almeida-Silveira et al., 1994; Canon e Goubel, 1995; Canon et al., 1998). Entretanto, no nosso estudo, foram observadas mudanças opostas nas características do CES.

Assim para esse músculo, pode ser sugerido um importante aumento da resistência da parte passiva do CES agindo contra a diminuição da resistência na sua parte ativa.

Enfim, nossos resultados mostram que as propriedades elásticas passivas são também modificadas pela desnutrição fetal. O conjunto dos testes mostra um aumento da rigidez dos elementos elásticos em paralelo, esse aumento da rigidez foi observado sob condições dinâmicas e estáticas assim como para pequenos ou grandes estiramentos. No entanto, é notado que essas modificações não são observadas sobre o soleus e EDL aos 90 dias de vida. As propriedades passivas do músculo são dependentes das estruturas membranárias e mais especificamente da concentração e do tipo de colágeno presente nas membranas, mas também de proteínas estruturais como a desmina e a titina. Vários estudos relacionam o conteúdo de colágeno às propriedades mecânicas passivas (Kovanen et al., 1984; Gosselin et al., 1998; Ducomps et al., 2003; Alnaqueeb et al., 1984). Estudos utilizando o treinamento muscular em mamíferos mostraram um aumento da rigidez passiva concomitante ao aumento do conteúdo de colágeno (Kovanen et al. 1989, Ducomps et al. 2003, Gosselin et al., 1998). Os estudos sobre o processo de envelhecimento também mostraram essa associação entre o colágeno e a rigidez passiva (Alnaqueed et al., 1984; Kovanen et al., 1984). Em relação aos efeitos do estado nutricional sobre a regulação do colágeno muscular, os resultados variam. Roy et al (2006) não referem nenhuma influência nutricional sobre o conteúdo de colágeno do músculo peitoral de galinhas, com, no entanto, modificações na estrutura do colágeno do perimísio. No gastrocnêmio de camundongos adultos desnutridos durante 2 dias, Jagoe e colaboradores (2002) referem uma diminuição da expressão dos genes que codificam numerosas proteínas como o colágeno. Mais recentemente, Stevenson e colaboradores (2005) estudaram o perfil transcricional de miotubos em condição de carência nutricional. Esses autores notaram uma diminuição da expressão dos genes implicados na síntese e maturação do colágeno (Stevensons et al., 2005). Contudo, os efeitos do aporte nutricional durante o desenvolvimento

fetal sobre o tecido conjuntivo muscular parecem diferentes. De fato, Karunaratne e colaboradores (2005) mostram aumento da quantidade de colágeno por unidade de área em filhotes de porcos que sofreram diminuição do aporte nutricional durante a gestação. No nosso estudo, tal fenômeno poderia explicar o aumento de tensão passiva observada nos ratos aos 25 dias de vida.

Além do colágeno, outras proteínas estruturais são fonte de tensão passiva. A titina, proteína filamentosa de 3MDa, liga a linha Z ao filamento de miosina. Wang e colaboradores (1991) demonstram que as propriedades elásticas passivas da fibra muscular são ligadas à expressão da isoforma de titina. Outrossim, Toursel e colaboradores (2002) mostraram uma diminuição da rigidez passiva no soleus de ratos suspensos relacionada com uma diminuição do conteúdo em proteína de titina. A proteína de desmina também mostrou seu papel na rigidez passiva (Salviati et al, 1990, Anderson et al, 2002). Enfim, a teletonina (Titin-cap) que tem um papel importante na implantação da parte N-terminal da titina sobre a linha Z (Trinick et al, 1999) e parece também ter influência sobre a rigidez passiva (Lee et al, 2006). O estudo de Byrne e colaboradores (2005) mostraram aumento da expressão de genes da desmina e da teletonina no músculo de bois desnutridos durante um curto período, revelando, então, a possibilidade de influenciar o conteúdo muscular nas suas diferentes proteínas sob o efeito da desnutrição. Enfim, no rato submetido a uma alimentação pobre em proteínas durante 2 semanas após o aleitamento, Oumi e colaboradores (2000) referem alterações ultraestruturais musculares. Mais precisamente, esses autores mostram uma desorganização sarcomérica com ruptura da linha Z adquirindo um aspecto retalhado e atribuindo essa «desintegração» estrutural a uma desordem das proteínas de desmina e de titina. Se é o caso, uma desorganização poderia então levar ao aumento na rigidez passiva. A ausência de desmina no camundongo geneticamente modificado levou a um aumento na rigidez passiva (Anderson et al, 2001), atribuindo esse aumento de rigidez a uma adaptação às estruturas passivas ligadas

a ausência de desmina. Os testes de relaxamento em diferentes velocidades nos têm permitido mostrar, sobre o músculo inteiro, que a resposta em tensão ao alongamento em condição passiva consiste num comportamento viscoso, viscoelástico e elástico como observado sobre a fibra isolada do músculo de rã (Bagni et al, 1995 ; 1999) ou sobre um feixe de fibras do músculo de rato (Mutungi et Ranatunga, 1996 ; 1998 ; Mutungi et al, 2003). Existe um debate quanto a contribuição seja das pontes actina-miosina, seja da molécula de titina (Hill, 1968 ; Moss et al, 1976 ; Bagni et al, 1992 ; 1995 ; Mutungi et Ranatunga, 1996 ; Mutungi et al, 2003) para explicar esse comportamento mecânico da CEP. No entanto, parece hoje que para a maioria dos autores, a participação da molécula de titina e mais precisamente a região I dessa molécula seja predominante no problema. Mutungi e Ranatunga (1996) e Muntungi e colaboradores (2003) referiram diferenças entre fibras lentas e rápidas não somente para o comportamento elástico, mas também para as características viscoelásticas e viscosas. Assim, a partir desses trabalhos, existe uma rigidez passiva, mas também uma viscosidade mais importante para fibras lentas comparativamente às fibras rápidas. Nossos resultados mostram, no solear e EDL de ratos aos 25 dias de vida, aumento não somente da rigidez passiva, mas também do coeficiente de viscosidade. Essas variações não podem, portanto, se explicar em termos de adaptações das características tipológicas porque não é observado aumento de fibras lentas no músculo sob o efeito da desnutrição. Em relação à viscosidade, parece que essa diferença entre as fibras não estão ligadas a uma diferença na viscosidade mioplasmática (ligada ao deslizamento inter-fibrilar), porque essa diferença persiste mesmo após ter sido descamado quimicamente, glicerinado e colocado num mesmo banho os dois tipos de fibras (Mutungi e Ratanunga, 1996, 1998). Esses autores atribuem, portanto, essa característica a uma estrutura intrasarcomérica e mais particularmente a titina.

Do conjunto desses dados, é, então, sugerido, que as modificações observadas em termos de comportamento mecânico passivo do músculo sob o efeito da desnutrição fetal seja

resultante de alterações nas estruturas endosarcoméricas e ou exosarcoméricas e dentre essas a molécula da titina parece ser o agente principal.

Nós podemos concluir que a desnutrição durante o desenvolvimento fetal leva a mudanças tanto das características contráteis quanto das propriedades do CES e do CEP com diferenças, no entanto, conforme a idade e os músculos estudados. O que quer seja, é provável que algumas dessas modificações das características mecânicas terão repercussões sobre a função postural e locomotora.

4.2. Estudo dos indicadores de desenvolvimento somático e sensório-motor.

RESUME EN FRANÇAIS

4.2. Étude des indicateurs de développement somatique et sensoriel

4.2.1. Matériel et Méthodes

4.2.1.1. Les animaux et groupes expérimentaux

Cette étude a été réalisée à l'Université Fédérale de Pernambuco.

Les groupes expérimentaux sont identiques à ceux de l'étude sur la caractérisation des propriétés mécaniques. 22 rats du groupe C et 20 rats du groupe D ont été utilisés pour l'évaluation du développement somatique et sensoriel du 1^{er} au 21^{ème} jour de vie.

4.2.1.2. Croissance somatique

Les groupes expérimentaux ont été soumis, du 1^{er} au 21^{ème} jour de vie, aux mesures suivantes (Silva et al., 2005):

- ❖ axe antero – postérieur du crâne (EAPC) (Figure 20A)
- ❖ axe latero - lateral du crâne (ELLC) (Figure 20B)
- ❖ longueur de la queue (CC) (Figure 20C)
- ❖ axe longitudinal du corps (EL) (Figure 20D).

4.2.1.3. Maturation de caractéristiques physiques

Chaque animal a été évalué, du 1^{er} au 21^{ème} jour, selon la maturation des caractéristiques physiques suivantes (Smart e Dobbing, 1971):

- ❖ ouverture du pavillon auditif (APA)
- ❖ ouverture du conduit auditif (ACA)
- ❖ irruption des incisives supérieures (IS)
- ❖ irruption des incisives inférieures (II)
- ❖ ouverture des yeux (AO).

4.2.1.4. Maturation des Réflexes

Les différents réflexes ont été évalués du 1^{er} au 21^{ème} jour post-natal et la date de maturation complète de chaque réflexe a été enregistrée.

Les réflexes évalués sont:

- ❖ préhension palmaire (Palm grasp-PP)
- ❖ récupération du décubitus (righting-RD)
- ❖ placement par les vibrissae (vibrissae placing-CV)
- ❖ aversion au précipice (Cliff avoidance-AP)
- ❖ géotaxie négative (negative geotaxis-GN)
- ❖ réponse au bruit (startle reflex-RS)
- ❖ réaction de redressement pendant la chute (free-fall righting-RA).

4.2.2 Analyse des Résultats

L'évaluation des mesures de la croissance somatique a révélé qu'il y a eu réduction de la longueur des axes antéro-postérieur et latéro-latéral du crâne jusqu'à 2 semaines de vie, une diminution de la longueur de la queue à partir de 2 semaines et une réduction de la longueur de l'axe longitudinal jusqu'au 21^{ème} jour sous l'effet de la dénutrition fœtale (Figure 22 et 23).

L'ensemble des résultats montre un retard de la maturation des caractéristiques physiques des rats sous l'effet de la dénutrition fœtale (Table 9).

A l'exception du réflexe de géotaxie négative, tous les autres réflexes ont présenté un retard dans l'âge de maturation (Table 10).

4.2.3 Discussion

La dénutrition prolongée induit un délai dans le taux de croissance organique et corporel (Ozanne et al., 1996). La mère soumise à une diète hypoprotéique pendant la gestation présente, pendant l'allaitement, une réduction de la quantité de lactose dans son lait avec des conséquences sur l'osmolarité et sur le volume de son lait (Grimble et al., 1987). Dans les modèles expérimentaux, la dénutrition maternelle pendant la gestation et l'allaitement conduit à l'épuisement des réserves maternelles et à une diminution des transferts d'éléments nutritifs à la progéniture, phénomènes qui participent aux faibles poids de la progéniture à la naissance et à un ralentissement de la croissance postnatale (Zhan et al., 2007). Ce phénomène est aussi important du point de vue de la programmation ("programming"), dans la mesure où les altérations allométriques et du taux de croissance pendant la période critique de développement sont associés à l'hypertension, au diabète type 2 et à l'obésité à l'âge adulte (Bonimonte, 1999, Desai et al., 2005).

La diminution de la croissance des mesures cranio-faciales dues à la dénutrition sont référées (Miller et al., 1999). Chez l'homme, les mesures du périmètre céphalique sont en rapport avec la taille du cerveau (Ivanovic et al., 1995; Weaver et Christian, 1980). Chez le rat, la dénutrition précoce postnatale retarde de manière permanente la division cellulaire, résultant en une baisse du nombre total de cellules dans l'organisme entier (Desai et al., 2005). Ces altérations dans le développement somatique peuvent indiquer des préjudices dans le développement du cerveau qui pourraient compromettre l'activité locomotrice des animaux.

Le développement retardé de l'AO, associé avec le retard de l'APA et de l'ACA en conséquence de la dénutrition intra-utérin peuvent altérer le développement de l'activité locomotrice. Il a été observé que des enfants aveugles peuvent avoir un retard dans les réflexes et un développement moteur ralenti (Warren, 1984). L'enfant aveugle va utiliser les expériences auditives et tactiles pour interagir avec l'environnement (Warren, 1984). Cependant, en vertu du retard dans la maturation du conduit auditif et du pavillon auditif chez le rat dénutri, l'audition sera compromise et les conséquences sur le développement de l'activité locomotrice sera plus important.

Le retard dans le réflexe de réponse au bruit est en rapport avec le retard de la maturation des caractéristiques physiques compromettant l'audition du animal. Ces resultats sont en accord avec les resultats de Rodriguez-Perez et al (1992) et Anselmo et al. (2006) qui ont observé un retard dans l'âge d'apparition des réflexes après dénutrition pendant les périodes de gestation et d'allaitement et pendant la période gestationnelle, respectivement. L'agression prénatale peut retarder la maturation de structures nerveuses impliquée dans le comportement moteur, en particulier le cerveau (Gopinath et al., 1976; de Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006). En fait, les études montrent que la dénutrition pendant la gestation et l'allaitement produit des effets nuisibles dans les structures cérébrales comme une réduction du poids du cervelet, un délai de la maturation et une diminution du nombre total de cellules du cortex cérébelleux (Gopinath et al., 1976; de Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006). La réduction de l'apport protéique pendant la gestation peut donc altérer le développement locomoteur de la progéniture, compromettant ainsi certains aspects importants pour la développement du mouvement comme la maturation somatique et sensorielle.

4.2. Estudo dos indicadores de desenvolvimento somático e sensório-motor.

4.2.1. Material e Métodos

4.2.1.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo de luz (6:00 às 18:00 h) e escuridão (18:00 às 6:00 h) constante. Os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Anexo A).

Para obtenção dos animais experimentais, foram acasalados ratos com idade de 90 dias na proporção de um macho para duas fêmeas nulíparas. Comprovando-se a cópula por esfregaço vaginal, considerou-se esse dia o dia zero da gestação. Confirmado o estado de gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidades, onde receberam água filtrada e dieta experimental *ad libitum*, segundo a manipulação nutricional imposta durante a gestação.

Foram utilizadas ninhadas de 06 neonatos machos por mãe. Os demais neonatos machos e as fêmeas seguiram para outros estudos experimentais realizados por outros pesquisadores. Um dia após o nascimento, os neonatos machos foram separados das respectivas mães para serem pesados e selecionados e todos os filhotes passaram a receber a

mesma dieta. Os grupos experimentais foram obtidos segundo o tratamento experimental realizado durante a gestação.

Segundo a manipulação nutricional os animais foram divididos em:

- *Grupo Controle (C, n=22)* – composto por filhotes cujas mães receberam dieta AIN-93G, gestação e crescimento (Reeves et al, 1993), caseína 17% de proteína durante a gestação (Tabela 1)

- *Grupo Desnutrido (D, n=20)* – foi composto por filhotes cujas mães receberam dieta hipoprotéica caseína 7,8%, durante a gestação (Tabela 1).

Após o nascimento, os filhotes receberam a dieta de manutenção do biotério, denominada “LABINA” (Agribands Purina do Brasil, LTDA) até os 90 dias de vida. Esta dieta é normoprotéica e contém 23,0% de proteína (Tabela 7).

Tabela 7 – Composição da dieta padrão “LABINA” (Purina do Brasil).

ENRIQUECIMENTO (KG DE RAÇÃO) (*):		NÍVEIS DE GARANTIA (*):	
Vitamina A	20000UI	Umidade (máx.)	13%
Vitamina D ₃	6000 UI	Proteína (mín.)	23%
Vitamina E	30 UI	Extrato Etéreo (mín.)	2,5%
Vitamina K	6 mg	Matéria Fibrosa (máx.)	9,0%
Vitamina B ₁₂	10 µg	Matéria Mineral (máx.)	8,0%
Vitamina B ₂	8 mg	Cálcio (máx.)	1,8%
Pantotenato de Cálcio	24 mg	Fósforo (mín.)	0,0%
Niacina	95 mg		
Tiamina	4 mg		
Colina	2000 mg		
Piridoxina	6 mg		
Biotina	0.1 mg		
Ácido Fólico	0.5 mg		
Manganês	50 mg		
Iodo	2 mg		
Ferro	65 mg		
Zinco	35 mg		
Cobre	26 mg		
Antioxidante	100 mg		

COMPOSIÇÃO BÁSICA (*): Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz Cru, Carboneto de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Sal, Pré-mix. (*) Segundo Purina do Brasil.

4.2.1.2. Avaliações do crescimento somático

Os grupos experimentais anteriormente delineados foram avaliados do 1º ao 21º dia de vida, das 12:00 às 14:00h quanto às seguintes medidas (Silva et al., 2005):

- *Eixo Antero-posterior do Crânio (EAPC)* – Para medida do eixo antero-posterior do crânio foi tomado como referência, uma linha que se estende do osso occipital na base do crânio até a extremidade do focinho. O animal foi contido com uma das mãos, mantendo-se a sua cabeça entre os dedos indicador e polegar e se realizou a medida em milímetros com auxílio de paquímetro. Figura – 20A
- *Eixo Látero-lateral do Crânio (ELLC)* – Este foi considerado, tendo como referência a linha imaginária perpendicular ao eixo longitudinal do crânio, dividindo os pavilhões auriculares ao meio. O animal foi contido com uma das mãos, e sua cabeça foi fixada entre o indicador e o polegar do examinador. Assim, com o auxílio do paquímetro, se realizou a medida em milímetros. Figura – 20B
- *Comprimento de cauda (CC)* – O animal foi contido delicadamente com uma das mãos do pesquisador. Em seguida, se encostou o trem posterior do animal na borda de uma mesa lisa e plana, tendo fixado em sua superfície papel milimetrado. Por sobre a mesa, a cauda do animal foi delicadamente mantida bem estirada. Com uma caneta, se fez marcas na superfície do papel milimetrado, coincidentes com a extremidade e a base da cauda. Medindo-se assim a distância entre os pontos obtidos em milímetros. Figura – 20C
- *Eixo longitudinal do corpo (EL)* – O eixo longitudinal foi medido, contendo-se o animal. Para tanto, delicadamente, o pesquisador com as mãos continha o animal de encontro à mesa na superfície com papel milimetrado tendo como ponto fixo para a cabeça do animal a borda lateral esquerda do papel milimetrado. Em seguida, com uma caneta, se fazia um

marca na superfície do papel milimetrado, coincidente com a base do corpo do animal.

Medindo-se a distância entre os pontos obtidos em mm. Figura – 20D.

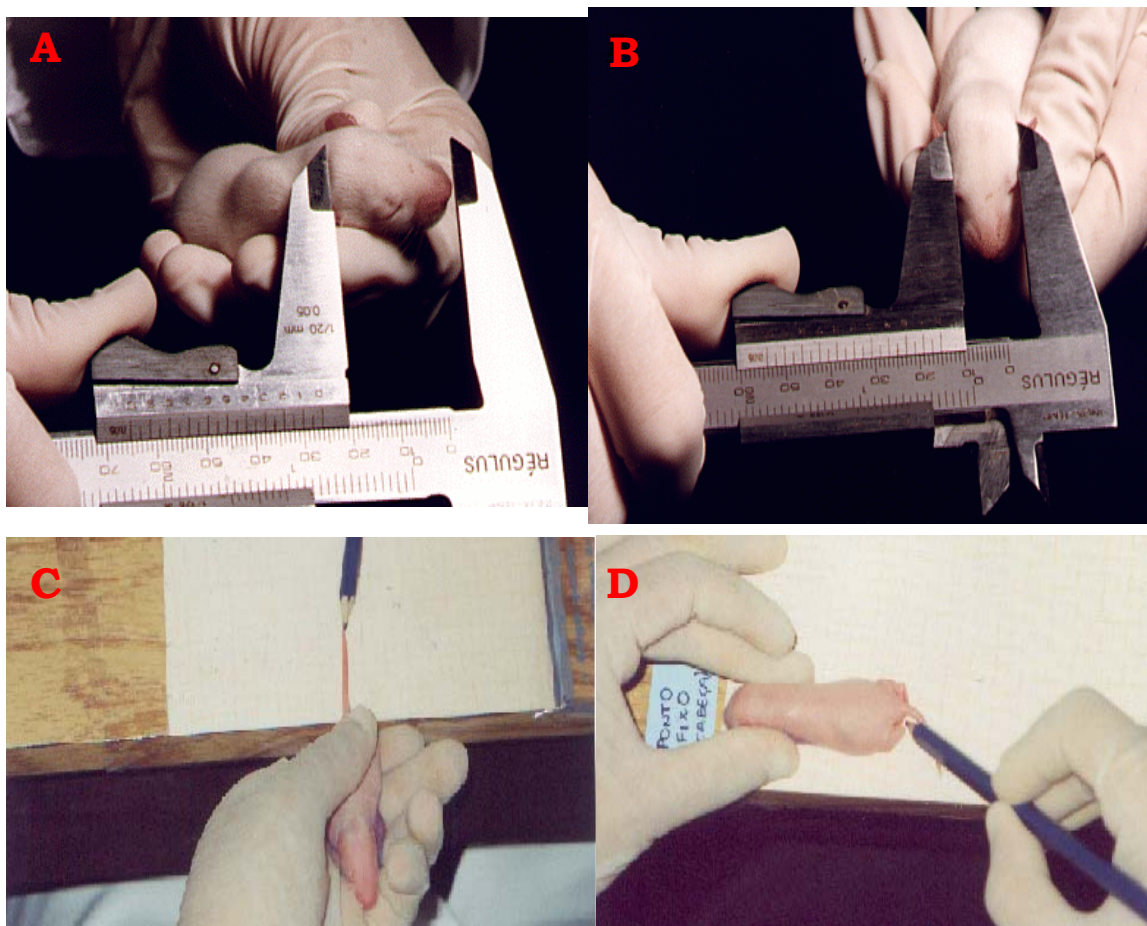


Figura 20. Fotos dos procedimentos de avaliação: A- eixo antero-posterior do crânio; B- eixo látero-lateral do crânio; C- comprimento da cauda; D- eixo longitudinal do corpo.

4.2.1.3. Avaliação da maturação de características físicas

Cada animal foi avaliado das 12:00 às 14:00h, quanto à maturação das seguintes características físicas (Smart e Dobbing, 1971) do 1º ao 21º dia:

Abertura do pavilhão auditivo (APA): Normalmente dobrado ao nascimento sobre o orifício auricular, o pavilhão desfaz a dobra durante a evolução ontogenética. Assim, a APA foi considerada no dia em que a dobra, uma vez desfeita, torna-se livre e podendo ser palpada pelo pesquisador.

Abertura do conduto auditivo (ACA): O conduto auricular primitivamente obliterado abre-se alguns dias após o nascimento. O conduto foi considerado aberto no dia em que o orifício auricular pode ser visualizado.

Irrupção dos incisivos superiores (IIS): Foi registrado o dia do rompimento da gengiva com exposição incisal, a erupção dos incisivos superiores.

Irrupção dos incisivos inferiores (II): A erupção dos incisivos inferiores foi registrada no dia do rompimento da gengiva com exposição incisal.

Abertura dos olhos (AO): Durante algum tempo após o nascimento, os olhos do rato encontram-se fechados. Assim, foi considerada esta característica no dia em que ocorreu a abertura total das pálpebras, permitindo a exposição normal dos olhos.

4.2.1.4. Avaliação dos indicadores de desenvolvimento sensório-motor

Para cada reflexo avaliado, o dia de sua consolidação foi considerado o primeiro da sequência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada. Todos os reflexos foram considerados positivos quando os animais conseguiam a resposta esperada em um período máximo de 10s.

Cada animal foi avaliado das 12:00 às 14:00h, do 1º ao 21º dia pós-natais, quanto ao desenvolvimento dos seguintes reflexos (Fox, 1965; Deiró et al., 2006): Preensão Palmar (PP); Recuperação de decúbito (RD), colocação pelas vibrissas (CV), aversão ao precipício (AP), geotaxia negativa (GN), resposta ao susto (RS) e reação de aceleração (RA) (Tabela 8).

Tabela 8: Procedimentos de detecção da maturação reflexa.

Reflexo	Estímulo	Resposta positiva
PP	Utilizando-se um bastonete, com aproximadamente 5 cm de comprimento por 1mm de diâmetro, para promover uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda de cada animal.	Flexão rápida dos dedos após duas tentativas. Reflexo é primitivo e inato, sendo sua presença indicativa de imaturidade do sistema nervoso, ou seja, com a maturação ocorre inibição deste reflexo. Registrava-se, portanto, o dia do seu desaparecimento como positivo.
RD	Colocação do rato em decúbito dorsal sobre uma superfície plana.	Giro do corpo do animal para assumir a posição de decúbito ventral apoiado nas quatro patas sobre a superfície.
CV	Suspensão do rato pela cauda de tal forma, que suas vibrissas tocassem levemente a borda de uma mesa.	O animal colocar as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar, num reflexo de marcha.
AP	Colocação do animal com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício.	Deslocamento do animal de 45° do precipício, caracterizando a aversão.
GN	Colocação do animal no centro de uma rampa de 45° de inclinação forrada com material antiderrapante (papel crepom), com a cabeça no sentido descendente.	Capacidade do animal voltar completamente, girando o corpo aproximadamente 140° e posicionando a cabeça em sentido ascendente.
RS	Submissão do rato a um estampido agudo, produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente também metálico.	Simultânea retração e imobilização rápida e involuntária do corpo do animal, característica do susto.
RA	Segurando-se o rato pelas quatro patas, com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano servirá como guia), era observada sua queda livre sobre um leito de espuma sintética (30 x 12 cm).	O animal conseguir girar completamente o corpo, voltando o ventre para baixo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas.

4.2.2. Análise dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente através do software Sigmastat 3.0. As medidas de peso corporal e crescimento somático (MCS): eixo látero-lateral (ELLC) e antero-posterior do crânio (EAPC), eixo longitudinal do corpo (EL), comprimento da cauda (CC) são representados como média $\pm$ EPM e comparados através do teste de análise de variância (ANOVA) One Way para medidas repetidas, seguido do teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$. A análise da maturação das características físicas: abertura do pavilhão auricular (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), irrupção dos incisivos superiores (IIS), irrupção dos incisivos inferiores (III) e abertura dos olhos (AO) bem como abertura do pavilhão auricular (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), irrupção dos incisivos superiores (IIS), irrupção dos incisivos inferiores (III) e abertura dos olhos (AO) e dos reflexos foram representados em mediana, sendo comparados os resultados entre o grupo Nutrido e Desnutrido através do teste de Mann-Whitney.

Do nascimento até o 14º dia de vida pós-natal, os filhotes de mães desnutridas mostraram redução no peso corporal em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figura 21).

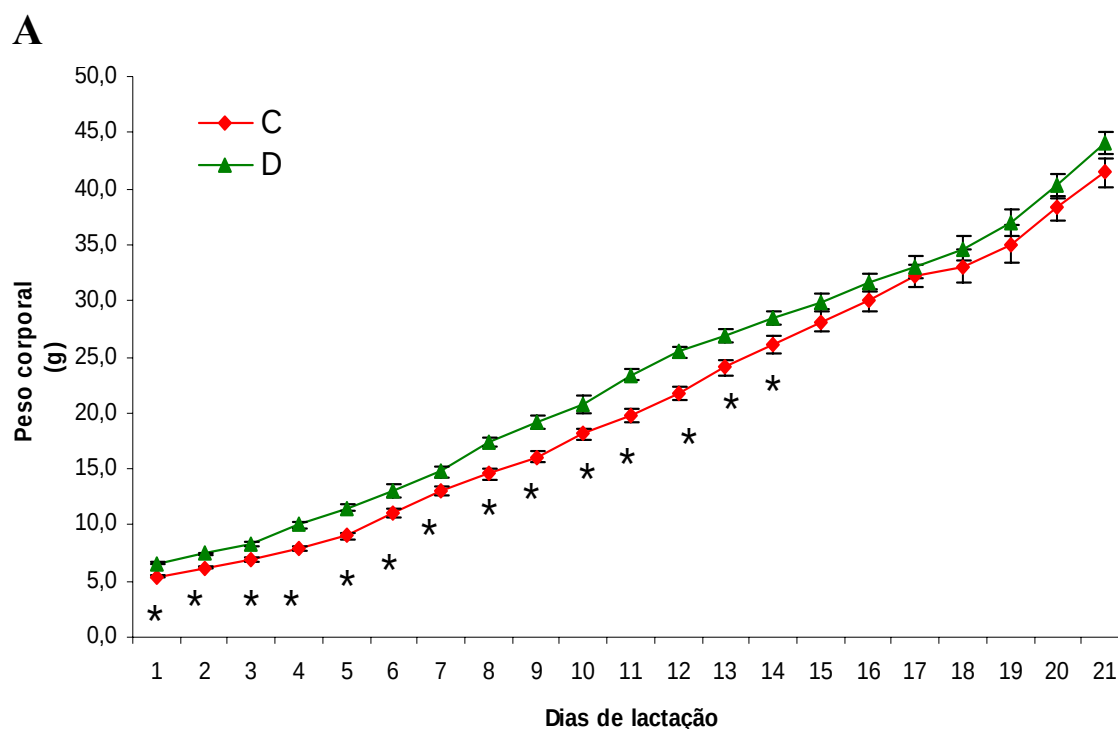


Figura 21. Média $\pm$ EPM do peso corporal dos ratos. C, grupo controle e D, grupo desnutrido. * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

A avaliação das medidas de crescimento somático revelou que o EAPC do grupo D foi menor ($p \leq 0,05$) do 1º ao 16º dia de vida em relação ao grupo C (Figura 22A). No grupo D, o ELLC apresentou –se menor ($p \leq 0,05$) quando comparado ao C, do 1º ao 15º dia de idade (Figura 22B). O grupo D apresentou menor CC comparado ao C ($p \leq 0,05$), do 14º dia ao 21º de idade (Figura 23A). Comparando-se C e D, verificou-se menor EL no D do 3º dia até o 21º dia de idade ($p \leq 0,05$) (Figura 23B).

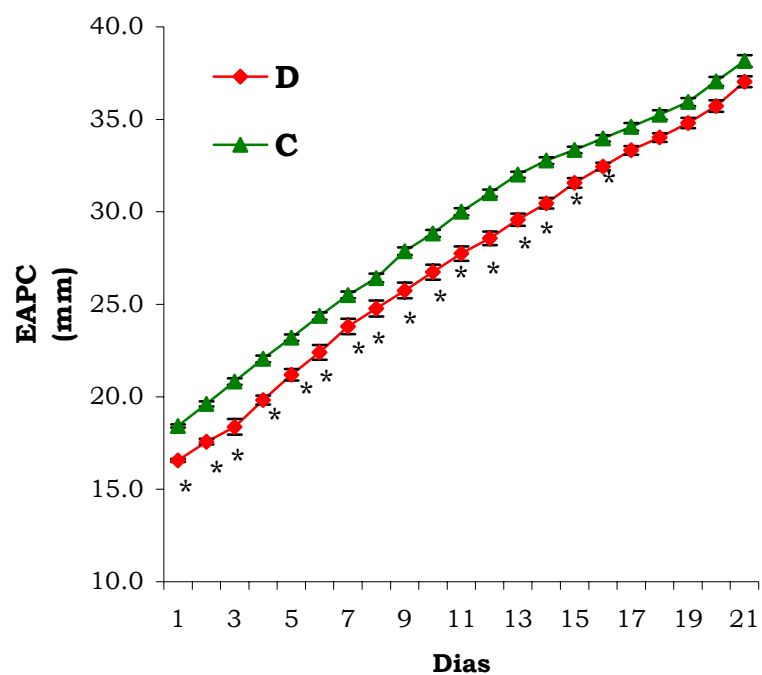
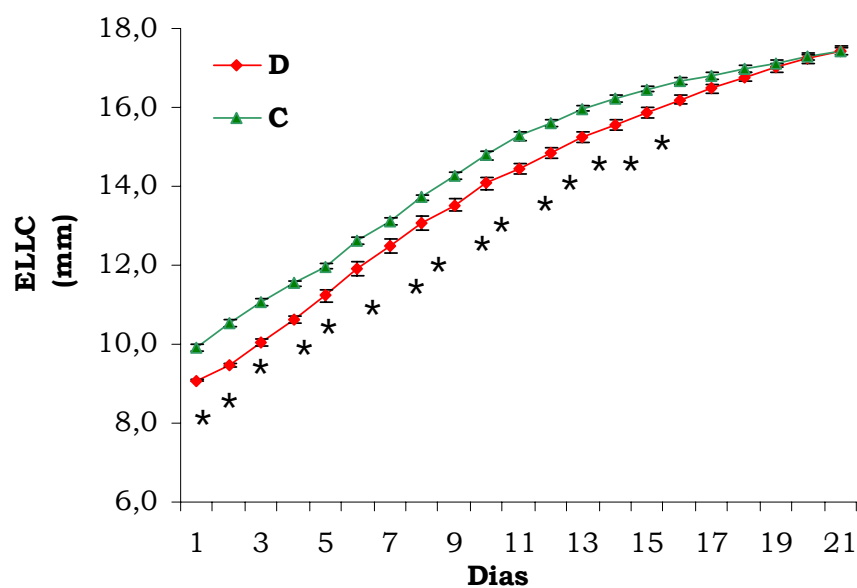
A**B**

Figura 22. Média $\pm$ EPM das medidas de crescimento somático do 1º ao 21º dia de vida dos ratos. **A**, análise do eixo antero-posterior do crânio- EAPC; **B**, análise do eixo látero-lateral – ELLC. C, grupo controle e D, grupo desnutrido. * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

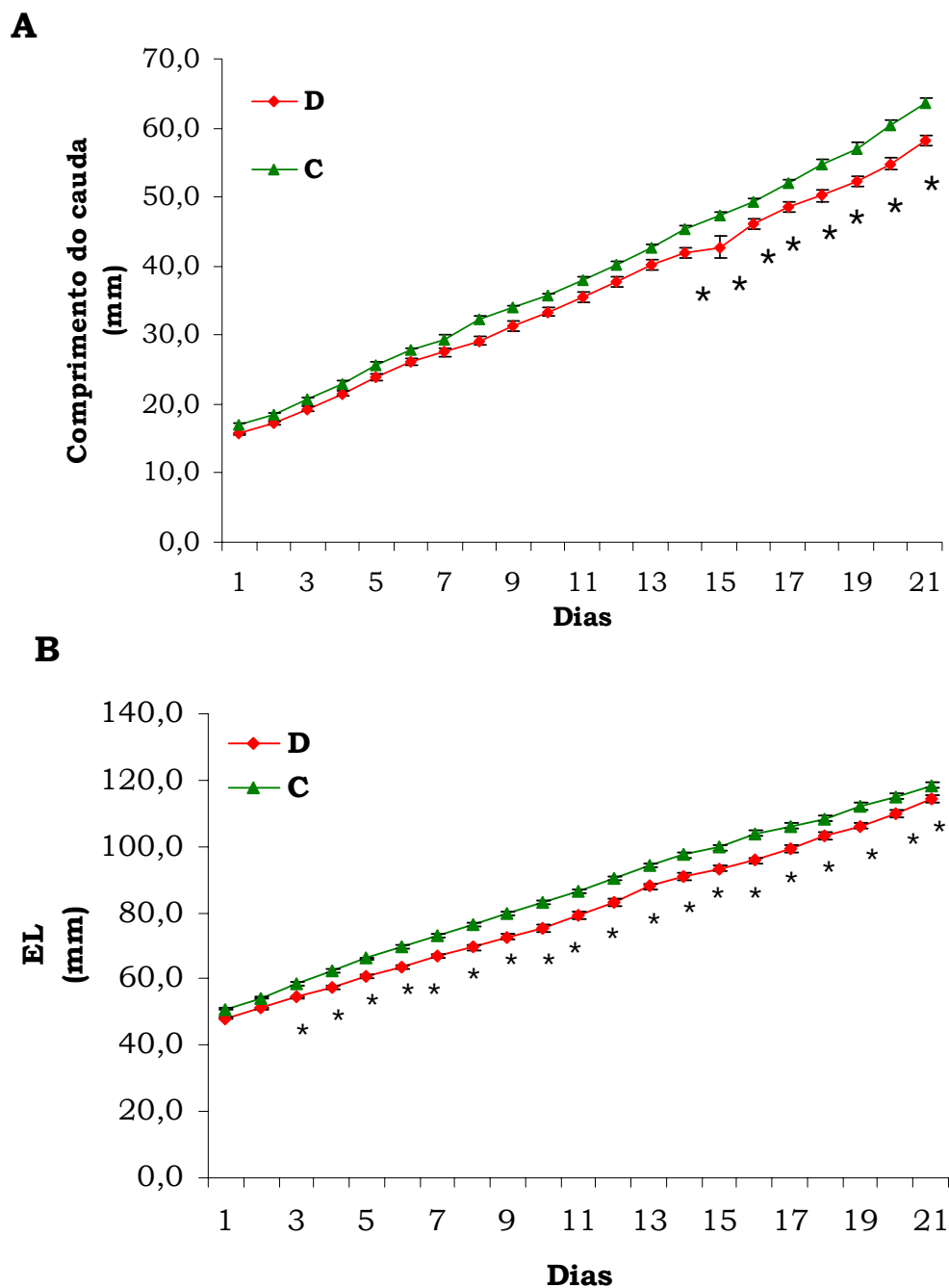


Figura 23. Média $\pm$ EPM das medidas de crescimento somático do 1º ao 21º dia de vida dos ratos. **A**, análise do comprimento da cauda-CC; **B**, análise do eixo longitudinal do corpo-EL. C, grupo controle e D, grupo desnutrido. * $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

Quanto às características físicas, ao se comparar os grupos C e D, verificou-se neste último grupo um atraso na data de maturação da abertura do pavilhão auricular - APA, da

abertura do conduto auditivo - ACA, da irrupção dos incisivos superiores – IIS, irrupção dos incisivos inferiores-III e da abertura dos olhos – AO (Tabela 9).⁷

Tabela 9. Mediana (Valores mínimos-Valores máximos) da maturação das características físicas dos ratos. C, grupo controle e D, grupo desnutrido.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS					
GRUPOS	Abertura do pavilhão auricular	Abertura do conduto auditivo	Irrupção dos incisivos superiores	Irrupção dos incisivos inferiores	Abertura dos olhos
C	3(2-5)	13(11-14)	9(7-12)	10(8-11)	13(12-16)
D	4(2-6)*	14(11-16)*	10(8-12)*	12(9-13)*	15(12-17)*

* $p < 0.05$ controle vs desnutrido.

Quanto à maturação dos reflexos, comparado ao grupo C, o grupo D apresentou retardo na maturação de preensão palmar - PP, recuperação de decúbito - RD, colocação pelas vibrissas-CV; da aversão ao precipício - AP; reação de aceleração - RA da resposta ao susto – RS. Não houve diferença entre os grupos para o reflexo de geotaxia negativa. (Tabela 10).

Tabela 10. Mediana (Valores mínimos-Valores máximos) da maturação das características físicas dos ratos. C, grupo controle e D, grupo desnutrido

REFLEXOS							
GRUPOS	Preensão Palmar	Recuperação do decúbito	Colocação pelas vibrissas	Aversão ao precipício	Reação de aceleração	Resposta ao susto	Geotaxia negativa
C	4 (3-5)	6 (5-8)	11 (9-14)	12 (9-16)	15(10-17)	13,5 (11-16)	14 (10-16)
D	5 (3-7)*	7 (5-9)*	13 (10-14)*	13(10-16)*	16(12-18)*	15 (14-17)*	14 (12-16)

. * p<0.05 controle vs desnutrido.

4.2.7. Discussão

Este estudo demonstra alterações no crescimento somático e desenvolvimento sensório-motor após desnutrição gestacional. Os filhotes de mães desnutridas mostraram menor peso ao nascer e retardo na maturação somática e sensório-motora. O período gestacional é considerado crítico para o desenvolvimento (Morgane et al., 1993). A resposta metabólica imediata à desnutrição é o aumento do catabolismo em que o organismo utiliza os próprios substratos como fonte de energia. A desnutrição durante a gestação e lactação induz a retardo na taxa de crescimento (Ozanne et al., 1996). A mãe submetida à dieta hipoprotéica durante a gestação reduz a quantidade de lactose com consequências sobre a osmolaridade e o volume do seu leite (Grimble et al., 1987; Moura e Passos, 2005). Em modelos experimentais, a desnutrição materna durante a gestação e lactação leva a depleção das reservas maternas e

ao menor transporte e transferência de nutrientes à prole, o que está associada à redução do peso ao nascer e do crescimento pós-natal (Zhan et al., 2007). Isso é também relevante do ponto de vista da programação, pois proporções alteradas na relação alométrica peso órgão/peso corporal e na taxa de crescimento no período crítico de desenvolvimento estão associadas à hipertensão, diabetes tipo 2 e obesidade na idade adulta (Barker, 1999, Desai et al., 2005).

No presente estudo, não apenas as medidas de crescimento crânio-faciais foram avaliadas, mas também aquelas referentes ao corpo (CC e EL). Alterações no CC e EL corroboram os achados que a desnutrição intra-uterina retarda o crescimento somático em ratos (Garofano et al., 1998). A diminuição da velocidade de crescimento das medidas crânio-faciais após denutrição precoce em ratos tem sido relatadas (Miller et al., 1999). As medidas de crescimento da cabeça estão relacionadas ao tamanho cerebral (Ivanovic et al., 1995; Weaver e Christian, 1980). A desnutrição durante o período neonatal afeta de forma permanente o crescimento, diminuindo a proliferação e o tamanho das células (Winick e Noble, 1966). Em ratos, a desnutrição precoce pós-natal retarda a divisão celular resultando na diminuição do número de células em todo o organismo e retarda o crescimento de forma permanente (Desai et al., 2005). Essas alterações no desenvolvimento somático podem indicar prejuízo no desenvolvimento cerebral o que poderia comprometer o desenvolvimento da atividade locomotora dos animais.

O atraso na maturação das estruturas que compõem a cabeça (abertura do pavilhão e do conduto auditivo, abertura dos olhos e irrupção dos incisivos) está relacionado ao retardo no crescimento somático (Garofano et al., 1998). Os achados do nosso estudo corroboram os de Smart e Dobbing (1971) também observaram retardo na irrupção dos incisivos e abertura dos olhos em ratos desnutridos. O desenvolvimento retardado da abertura dos olhos,

associado ao retardo da abertura do pavilhão e do conduto auditivo consequente a desnutrição intra-uterina pode prejudicar o desenvolvimento da atividade locomotora nos animais. Crianças cegas podem apresentar atraso na ontogenese reflexa e um desenvolvimento motor mais lento (Warren, 1984). A criança cega irá utilizar as experiências auditivas para interagir com o meio (Warren, 1984). No entanto, em virtude, do atraso no desenvolvimento do conduto e do pavilhão auditivo no rato desnutrido, a audição será comprometida e isso pode tornar ainda maiores as consequências sobre essa fase importante do desenvolvimento motor.

No presente estudo, observamos que a desnutrição durante a gestação levou ao retardo na maturação de seis dos sete reflexos avaliados, o reflexo de geotaxia negativa não foi afetado. O retardo para a resposta ao susto está relacionado ao atraso na maturação das características físicas que compromete a audição do animal. Rodriguez-Perez e colaboradores (1992), corroborando os nossos achados observaram retardo na idade de aparecimento dos reflexos após desnutrição durante a gestação e lactação. Anselmo e colaboradores (2006) também observaram retardo na maturação reflexa após a desnutrição durante o período gestacional. Dentre os reflexos retardados nos desnutridos, o reflexo de colocação das vibrissas se caracteriza pela necessidade de uma coordenação motora precisa (Patin et al., 2004). Isso sugere que a agressão pré-natal pode retardar a maturação de estruturas nervosas envolvidas no comportamento motor, particularmente o cerebelo. De fato, estudos mostram que a desnutrição durante a gestação e lactação produz efeitos deletérios em estruturas cerebrais; como redução no peso cerebelar, retardo na maturação e diminuição no número total de células do córtex cerebelar (Gopinath et al., 1976; de Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006).

O funcionamento dos reflexos aqui estudados constitui-se na primeira experiência motora do neonato e favorecem a evolução de padrões motores maduros (Capute et al., 1982). A partir da atividade reflexa, os indivíduos obtêm informações sobre o ambiente (Knapczyk,

2001). Se ocorrerem danos nessa etapa inicial, a de maturação dos reflexos, associado à alteração no desenvolvimento somático, os processos sequenciais no desenvolvimento da atividade locomotora serão afetados. Estudos epidemiológicos e modelos experimentais que analisam a manipulação nutricional pré e pós-natal durante períodos críticos do desenvolvimento têm efeitos persistentes sobre os indivíduos adultos (Lucas, 1999). Estudos demonstram que alterações nas habilidades comportamentais e de aprendizagem podem estar associadas a agressões nutricionais durante a gestação e lactação (Anselmo et al., 2006). A redução protéica durante a gestação pode alterar o desenvolvimento locomotor do indivíduo, uma vez que irá comprometer aspectos importantes para a composição do movimento como a maturação somática e reflexa.

4.3. Estudo do desenvolvimento da atividade locomotora em ratos

RESUME EN FRANÇAIS

4.3. Étude du développement de l'activité locomotrice chez le rat

4.3.1. Matériel et Méthodes

4.3.1.1. Animaux et Groupes Expérimentaux

Cette étude a été réalisée à l'Université Fédérale de Pernambuco.

Les groupes expérimentaux sont identiques à ceux de l'étude sur la caractérisation des propriétés mécaniques. 22 rats du groupe C et 20 rats du groupe D ont été utilisés pour l'évaluation du développement de l'activité locomotrice.

4.3.1.2. étude de l'activité locomotrice

L'enregistrement de l'activité locomotrice (AL) a toujours été réalisée entre 18:00 et 19:00h, après le début du cycle nocturne afin de vérifier le comportement des animaux pendant la période où ils sont le plus actif. Les enregistrements ont été conduits sur les rats âgés de 8, 14, 17, 21 et 90 jours.

En collaboration avec le Département de Physique et le Génie Biomédical de l'Universidade Federal de Pernambuco, un système de monitoring de l'activité locomotrice pour petits animaux a spécialement été élaboré. Il s'agit d'un champ circulaire ($\varnothing = 1\text{m}$) de surface noire afin d'optimiser le contraste avec le rat et favoriser l'isolement de son image prise par une caméra vidéo numérique infrarouge liée à un microordinateur équipé d'une carte d'acquisition d'images (figures 24 et 25). Le rat est ainsi filmé dans une ambiance nocturne pendant deux minutes. Chaque image, espacée de 0.66s, est traitée numériquement afin d'isoler le rat de son environnement et de reconstituer sa trajectoire (figure 26).

Les paramètres calculés sont :

- ❖ Distance totale parcourue
- ❖ Vitesse moyenne
- ❖ Puissance moyenne
- ❖ Nombre de fois où l'animal est resté immobile
- ❖ Durée totale d'immobilité
- ❖ Durée moyenne d'immobilité par arrêt, calculé par le rapport entre la durée totale d'immobilité et le nombre de fois où l'animal est resté immobile.

Pour l'analyse de la trajectoire des animaux, la surface totale du champ d'exploration a été divisée en 5 zones par des champs circulaires de 10, 20, 30, 40 et 50 cm de rayon (figure 27). Ainsi furent établies les cinq régions suivantes: Aire 1 (0 à 10 cm), Aire 2 (10 à 20 cm), Aire 3 (20 à 30 cm), Aire 4 (30 à 40 cm) et Aire 5 (40 à 50 cm) (Figure 26 et 27).

4.3.2. Analyse des Résultats

La dénutrition pré-natale induit (Figures 28 à 34):

- ❖ Une baisse du poids corporel au 8^e, 14^e, 17^e et 21^e jours;
- ❖ Une augmentation de la distance totale parcourue, de la vitesse moyenne et de la puissance moyenne au 14^e et 17^e jours;
- ❖ Une diminution de la durée totale d'immobilité au 14^e, 17^e et 21^e jours;
- ❖ Une augmentation du nombre de fois où l'animal est resté immobile au 14^e et 17^e jour;
- ❖ Une diminution de la durée moyenne des arrêts au 14^e et 17^e jour.

L'analyse de la trajectoire des animaux dénutris montre que (Tableau 11) :

- ❖ Au 8^e jour, il n'y a pas de différences entre les groupes.
- ❖ Au 14^e jours, les rats dénutris passent moins de temps dans la zone centrale n°1 et plus de temps dans les zones périphériques 4 et 5
- ❖ Au 17^e jour, la zone centrale est moins occupée en faveur des zones intermédiaires 3 et 4

- ❖ A 21 jours, la trajectoire des rats dénutri n'est pas significativement différente de celle des animaux du groupe C
- ❖ A l'âge adulte, les rats dénutris restent plus de temps dans les zones centrales 1 et 2 et moins de temps dans la zone périphérique 5.

4.3.3. Discussion

Nos résultats ont montré qu'un environnement prénatal inapproprié induit un développement anormal du poids et de l'activité locomotrice. Dans cette étude, un déficit du poids a été observée chez les rats de mères soumises une alimentation appauvri en protéines pendant la gestation au 8°, 14°, 17° et 21° jours. Comme nous l'avons déjà mentionné et discuté dans nos études précédentes, cette réduction du poids corporel après la dénutrition pré et/ou post-natale chez le rat est largement renseignée (Smart et Dobbing, 1971; Prakash et al., 1993; Brozanski et al. 1993).

La dénutrition fœtale a entraîné une augmentation de la vitesse moyenne, de la distance parcourue et de la puissance moyenne aux 14^{ème} et 17^{ème} jour de vis. Aussi, au même âge, les animaux dénutris montrent un déficit dans la durée totale où l'animal est resté stationnaire, associé à une augmentation du nombre d'arrêt, ce qui entraîne une diminution importante de la durée moyenne par arrêt. L'animal dénutri se déplace plus et augmente sa vitesse moyenne de déplacement. Les animaux dénutris montrent un retard dans la maturation somatique et dans l'ontogénèse réflexe, ce qui contribue à l'élaboration de modèles moteurs inappropriées (Barros et al., 2006; Anselme et al. 2007). Chez les rongeurs, la dénutrition pré et/ou post-natale entraîne des dommages structurels dans les régions du cerveau avec une diminution du poids et du nombre de cellules du cervelet ainsi qu'une réduction du nombre de

neurones dans l'hippocampe (Cintra et al., 1997e et b; Lamb et al., 1985; De Bassio et al., 1996; Diaz-Cintra et al., 1990; Gopinath et al., 1976, De Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006). Les rats dénutris au cours du développement présentent aussi plusieurs altérations comportementales irréversibles (Almeida et al. 1996a; Almeida et al., 1996c; Jaiswal et al., 1996; Moreira et al., 1997, Castro et al., 1987; Castro et al., 1993; Celedon et al., 1979; Cordova et al., 1994). Ainsi, il a été rapporté une augmentation du comportement exploratoire (Almeida et al., 1996; Duran et al., 2005), une augmentation de l'anxiété et une plus grande labilité émotionnelle (Sobotka et al., 1974; Téodosie et al., 1979 ; Jaiswal et al., 1996) et un déficit mémoriel des animaux (Cordova et al., 1994). Ces altérations du comportement pourraient affecter de façon négative l'acquisition d'un modèle locomoteur normal. Certains auteurs ont démontré que les animaux dénutris présentent des comportements moteurs différents (Téodosio et al., 1979; Barros et al., 2006), ces altérations pouvant faire suite à des altérations dans le comportement émotionnel, avec exacerbation des réponses d'anticipation liées au stress (Téodosio et al., 1979; Jaiswal et al., 1996) et augmentation de mouvements volontaires sans objectifs définis (Téodosio et al., 1979; Duran et al., 2005). L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer la diminution des temps d'arrêt des rats dénutris telle qu'observée dans notre étude ainsi que l'hyperactivité pendant le période post-natale précoce.

Différents travaux ont été consacrés à l'étude de la trajectoire des animaux au cours de leur activité locomotrice (Lukoyanov et al., 1999; Yaski et al., 2008). Les différences observées dans l'évolution des capacités motrices des animaux dénutris peuvent être liés à des lacunes dans le comportement des animaux (Khana et al., 1994; Hall, 1984). Dans notre étude, lorsque les rats dénutris sont placés dans un espace circulaire délimité par une paroi, à partir de la deuxième semaine, ils couvrent les zones les plus reculées du champ par rapport où ils sont initialement posés alors que les animaux contrôles visitent et restent plus dans la zone initiale. Ce comportement chez des animaux contrôles a déjà été rapporté par Yaski et al.

(2008). Ces changements peuvent être liés à l'augmentation de la distance parcourue, de la vitesse, de la puissance et à la diminution du temps d'arrêt total à l'âge de 14 et 17 jours. En outre, dans un labyrinthe, certains auteurs indiquent que les animaux dénutris augmentent la déambulation dans la partie périphérique du labyrinthe (Castellano et al., 1976; Lukoyanov et al., 1999). Cette tendance de l'animal à chercher les bords de l'espace circulaire indique un haut niveau de réactivité émotionnelle (Lukoyanov et al., 1999). Par ailleurs, Prut et Belzung (2003) rapportent que le temps passé dans la zone centrale est inversement lié à l'anxiété. La réduction de ce temps par les rats dénutris à 14 et 17 jours ainsi que la recherche des bords de l'espace dans notre étude semblent donc indiquer une augmentation de l'anxiété chez ces animaux. Un autre aspect important est que, à partir de cet âge (14^ojour), les yeux s'ouvrent, ce qui aura une influence sur les mouvements des animaux (Fox, 1965; Geisler et al., 1993). Avant l'ouverture des yeux, les mouvements de la tête sont effectués seulement pendant les pauses de la locomotion ; dès que la vision apparaît, les rats peuvent examiner attentivement l'environnement avec des mouvements de la tête, tout en marchant (Geisler et al., 1993). Ainsi, comme mentionné dans notre étude sur la maturation somatique, les animaux dénutris pendant le développement fœtal ont un retard dans l'ouverture des yeux (les animaux souffrant de malnutrition ont ouvert les yeux autour du 15^o jour de vie, tandis que les contrôles autour du 13^o jour de vie post-natale) ; ce dernier phénomène pouvant aussi influencer les différences observées entre les contrôles et les dénutris.

A la troisième semaine de vie post-natale, Westerga et Gramsbergen (1990) ont montré que, en condition contrôle, les rats ont un comportement locomoteur proche du comportement adulte. L'absence de différences de l'activité exploratoire des animaux dénutris par rapport aux rats contrôle peut être liée à l'absence de différences dans les valeurs de vitesse moyenne, de distance parcourue et de puissance entre ces deux groupes à l'âge de 21 jours. Dans notre étude, l'hyperactivité observée chez les rats dénutris dans la deuxième

semaine de vie post-natale n'est plus observée à 21 jours. Certains auteurs rapportent que l'hyperactivité observée dans ces conditions peut être liée à la nouveauté de l'environnement pour l'animal, et qu'elle disparaît quand cet environnement devient familier (Holson et Walker, 1986). En plus, d'autres auteurs montrent que la dénutrition périnatale favorise le déficit mémoriel des animaux adultes, même après une longue période de recouvrement (Cordova et al., 1994, Castro et al., 1987; Celedon et al., 1979; Goodlett et al., 1986). Si ce déficit se produit chez les rats dénutris pendant le développement fœtal, ce phénomène pourrait alors être responsable en partie de l'hyperactivité observée avant 21 jours du fait du retard dans l'habituation de l'environnement. Il est enfin important de prendre en compte le retard dans l'ontogénèse réflexe du fait de la dénutrition, retardant la perte des réflexes primitifs et donc, ralentissant l'acquisition du comportement moteur mur (Barros et al., 2006; Anselme et al., 2007).

À l'âge adulte, les rats dénutris restent plus au centre du champ circulaire. Certains comportements adultes trouvent leur origine dès la période périnatale chez les rongeurs. Par exemple, une altération des rapports avec la mère modifie la perception de l'environnement et peut avoir des effets défavorables sur le développement (Meaney et al., 2001). Ces adaptations programment la réactivité au stress et le comportement adulte de la portée ; en plus, elles influencent la relation entre la mère et l'enfant dans leurs futures générations. D'autres auteurs indiquent que les animaux dénutris pendant le développement fœtal ont tendance à être moins actifs à l'âge adulte (Vickers et al., 2003), ce comportement sédentaire étant dans ce cas déterminé pendant la période prénatale. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour comprendre comment une agression prénatale pourraient compromettre le mode de vie des animaux. Les altérations du développement sensoriel mais aussi des propriétés mécaniques du muscle telles qu'observer dans notre projet peuvent aussi contribuer aux altérations du comportement locomoteur adulte (Anselmo et al., 2007; Barros et al., 2004; Toscano et al.,

2006). La dénutrition prénatale a donc eu des répercussion à long terme dans le comportement locomoteur, même après un rééquilibrage de l'alimentation pendant la vie post-natale.

4.3. Estudo do desenvolvimento da atividade locomotora em ratos

4.3.1. Material e Métodos

4.3.1.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 46 ratos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo de luz (06 às 18h) e escuridão (18 às 06h) constante. Os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Anexo A).

Para obtenção dos animais experimentais, foram acasalados ratos com idade de 90 dias na proporção de um macho para 2 fêmeas nulíparas. Em seguida, utilizaram-se os mesmos procedimentos experimentais do item 4.2.1. para diagnóstico da gestação e preparo das ninhadas. A manipulação nutricional imposta na gestação obedeceu aos mesmos procedimentos experimentais descritos no item 4.2.2. Assim durante a gestação, as ratas foram alimentadas com uma dieta controle (17% de proteína) de acordo com as recomendações da “AIN-93G” (Reeves et al., 1993) (Grupo Controle - C, n=22) ou uma dieta hipoprotéica e isocalórica (7,8% de proteína) (Grupo Desnutrido - D, n=20) (Tabela 1). Após 24 horas do nascimento, as ninhadas foram limitadas a seis filhotes machos para cada mãe e os filhotes neonatos foi amamentados por mães que receberam a dieta de manutenção do

biotério, denominada “LABINA” (AgribRANDS Purina do Brasil, LTDA) até os 90 dias de vida. Esta dieta é normoprotéica e contém 23,0% de proteína (Tabela 7).

O peso dos filhotes (balança, Marte AS 1000C®, classe II, capacidade máxima 1000g, menor divisão 0,01g) foi registrado ao nascer, no 8°, 14°, 17°, 21° e 90° dias de vida a fim de acompanhar a taxa de crescimento desses animais para cálculos de alguns parâmetros biomecânicos.

4.3.1.2. Estudo da atividade locomotora

O registro de atividade locomotora (AL) foi sempre realizado no horário entre 18:00 as 19:00 h, após iniciar o ciclo escuro do biotério para favorecer uma expressão comportamental mais condizente com o ciclo natural de vigília do rato, um animal notívago. O registro de imagens da AL foi realizado numa sala escura, mantendo-se acesa apenas uma lâmpada vermelha de espectro não irritante para os ratos o que permitia a visualização destes durante o experimento.

Foram avaliados os filhotes de ratos Wistar durante o período de aleitamento, no 8°, 14°, 17°, 21° e na idade adulta no 90° dia de vida pós-natal. As idades observadas durante a lactação foram determinadas a partir de um estudo piloto, no qual a atividade locomotora espontânea de filhotes foi registrada em vídeo diariamente, do 1° ao 21° dias pós-natais, em duas ninhadas de tamanho semelhante e não submetidas a qualquer manipulação. A partir dos achados do estudo piloto e da literatura foram selecionadas as idades que representavam importantes mudanças no comportamento motor.

Em cooperação com o Departamento de Física, com a colaboração do Curso de Graduação em Engenharia Biomédica, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, um sistema de monitoramento do movimento de pequenos animais em campo aberto foi desenvolvido e aprimorado. O sistema consiste em um campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$), delimitado por paredes de 30 cm de altura (Figura 24 e 25). Durante um intervalo de tempo pré-definido de dois minutos, a livre movimentação do animal foi registrada. A partir deste registro, várias grandezas físicas são extraídas. Essas grandezas são, então, processadas a fim de se obter informações sobre o comportamento do animal.

A filmagem era iniciada quando o animal estava posicionado no centro do campo aberto, cuja cor foi escolhida de forma a maximizar o contraste entre o animal e o fundo. Assim, foi utilizado um fundo preto. Uma câmera digital (VTR[®] 6638 – CCTV System) foi posicionada na linha vertical que passa pelo centro do campo aberto, fixada ao teto da sala, sendo sua distância do local de fixação até o solo do campo aberto igual a 2,65 m (Figura 24). A câmera possui sensor de Infravermelho e um LED de iluminação. Apresenta resolução de 420 linhas e velocidade entre 1/60 e 1/100 s, e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, até 0,1 lux.

A câmera possui sincronização interna com placa de vídeo. O filme é assim enviado para um computador equipado com placa de aquisição de vídeo e software dedicado às tarefas de aquisição de imagem, através de uma interface (Figura 24).

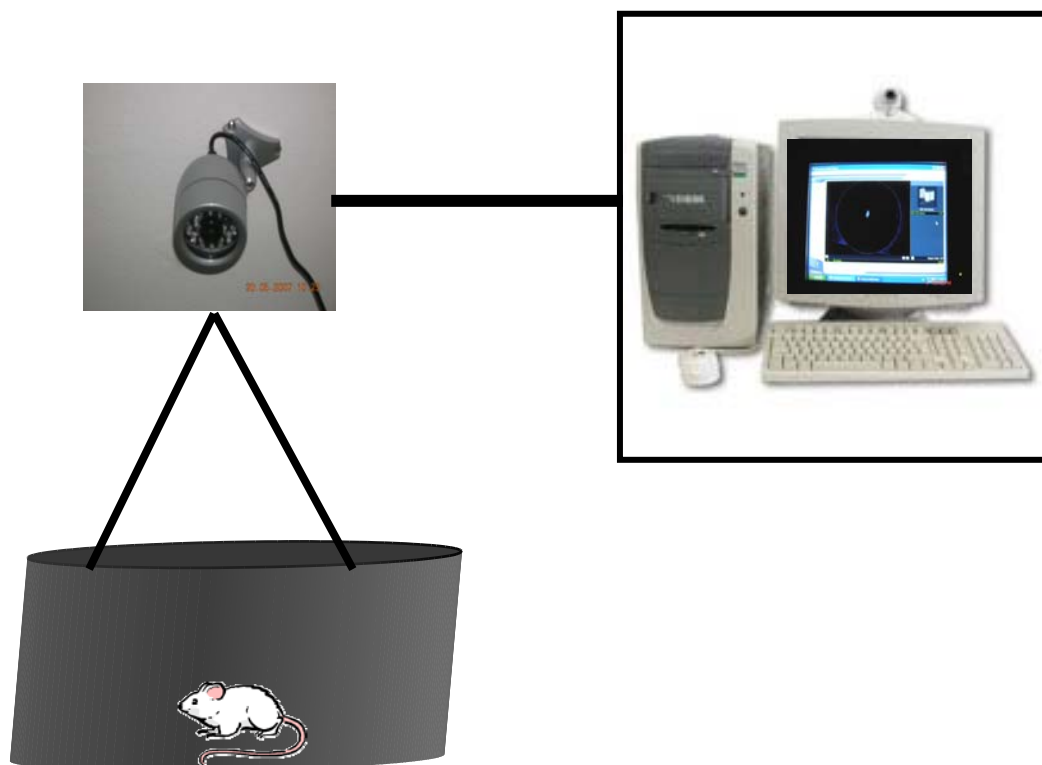


Figura 24. Registro das imagens durante o estudo da atividade locomotora.

No computador, o filme é convertido em quadros (aproximadamente 180 para cada registro de dois minutos, num intervalo de tempo de 0,662 s entre os quadros) para processamento posterior. Para a análise dos registros de imagens, foi selecionado um quadro a cada 20 registrados.

Através de técnicas de processamento digital de imagens, cada quadro é filtrado de forma a isolar o suporte dos objetos que estão no entorno (Fig. 25). Na etapa seguinte são determinadas as coordenadas da imagem do animal quadro a quadro e assim é possível reconstruir o percurso desempenhado pelo animal.

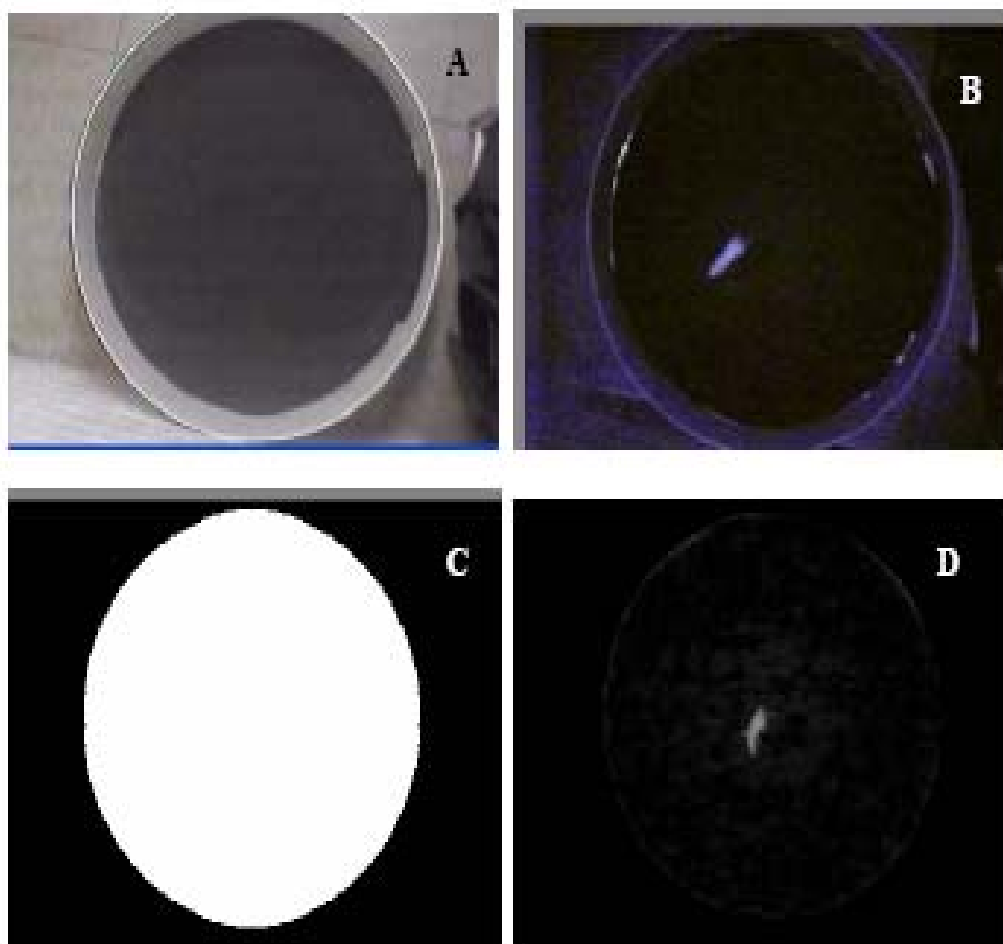


Figura 25. Análise da atividade locomotora. A. Imagem do campo aberto, no claro. B, Imagem do campo aberto durante filmagem no escuro. C, Quadro preparado para isolar o suporte dos objetos que estão no entorno da imagem do campo aberto durante o processamento da imagem. D, imagem final para processamento das imagens e cálculos.

Foi também desenvolvido um conjunto de programas composto por *softwares* de aquisição e extração de quadros a partir de diversos formatos de vídeo, utilizando linguagem *Object Pascal*, e um sistema em MATLAB® para processamento e segmentação semi-automática de imagens e cálculo das variáveis físicas de interesse.

De posse do percurso percorrido pelo animal, do intervalo de tempo entre os quadros e da massa do animal, foi possível calcular os seguintes parâmetros obtidos para cada animal: 1- a distância percorrida, 2- a velocidade média; 3- a potência muscular; 4- o número de paradas; o 5- período de tempo em que o animal permaneceu parado durante o intervalo de registro; 6- a relação tempo total parado pelo número de paradas.

Na determinação da velocidade média, utilizou-se:

$$V_m = \frac{\text{distância total (m)}}{\text{Nº de quadros} \cdot \text{amostragem (s)}}$$

Para a determinação da Potência muscular, calculou-se inicialmente a Energia Cinética (E_c), a partir de:

$$E_c = \frac{m \cdot V^2}{2000}$$

onde **m** é a massa do animal (no programa, em gramas) e **V** a velocidade em m/s. Assim, para a potência, utilizou-se:

$$\text{Pot} = \frac{\Delta E_c}{\Delta t}$$

sendo a resultante multiplicada por 1000 para se expressar em mW.

Após as análises desses parâmetros físicos, o sistema de monitoramento para pequenos animais foi aprimorado no presente trabalho a fim de permitir a monitorização da trajetória desempenhada pelos animais. Utilizando técnicas de processamento digital de imagens foram determinados 180 pontos referentes ao centro de massa do animal, sua série de localização indicava a trajetória do referido animal nos 120 segundos que dura a aquisição (Figura 26 e 27).

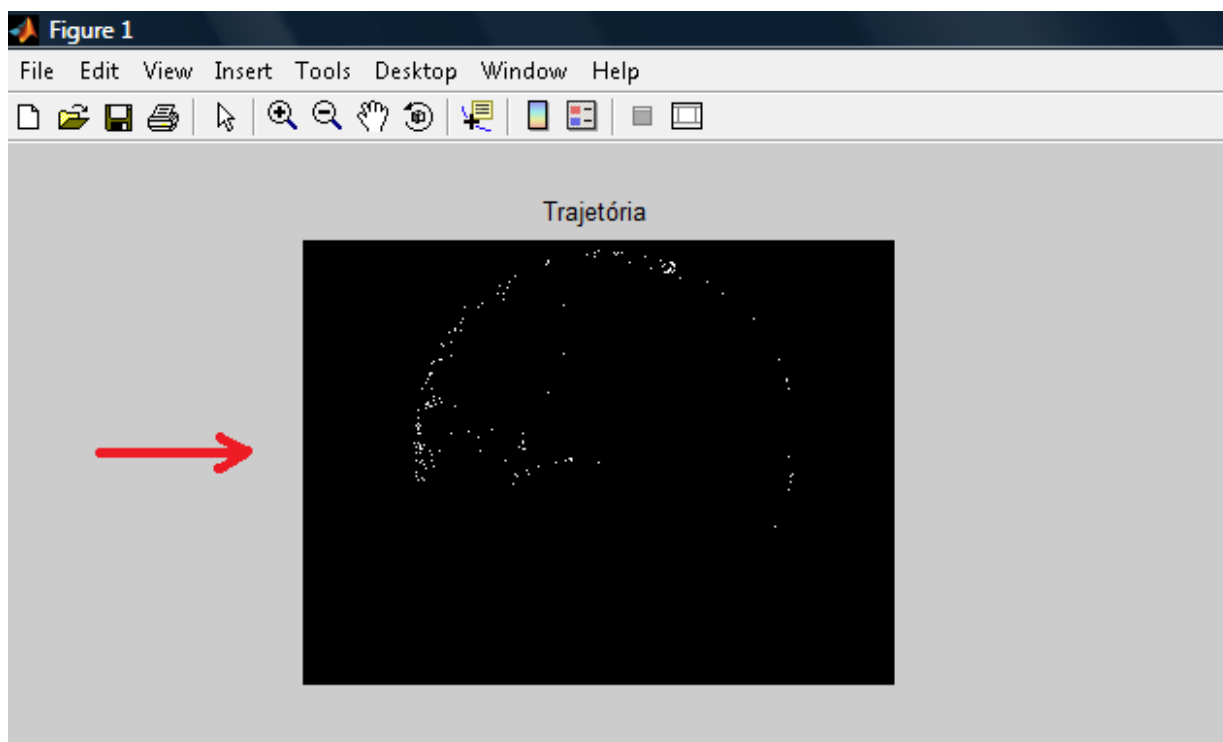


Figura 26. Processamento de imagens para análise de trajetória. Pontos brancos em fundo negro representam centro de massa do animal no campo aberto durante o registro da atividade locomotora.

O raio do campo aberto, de 50 cm, foi dividido em crescentes de razão aritmética 10 cm. Tendo com resposta final, circunferências de raios 10, 20, 30, 40 e 50 cm. Assim foram estabelecidas cinco áreas: Área 1 (0 a 10cm), Área 2 (10 a 20cm), Área 3 (20 a 30cm), Área 4 (30 a 40cm), Área 5 (40 a 50cm) a serem exploradas pelos animais nas diferentes idades (Figura 26 e 27). A partir da exploração realizada pelo animal nas diferentes áreas e do tempo em cada Área durante os 120 segundos de registro da atividade locomotora, pode-se monitorizar a trajetória.

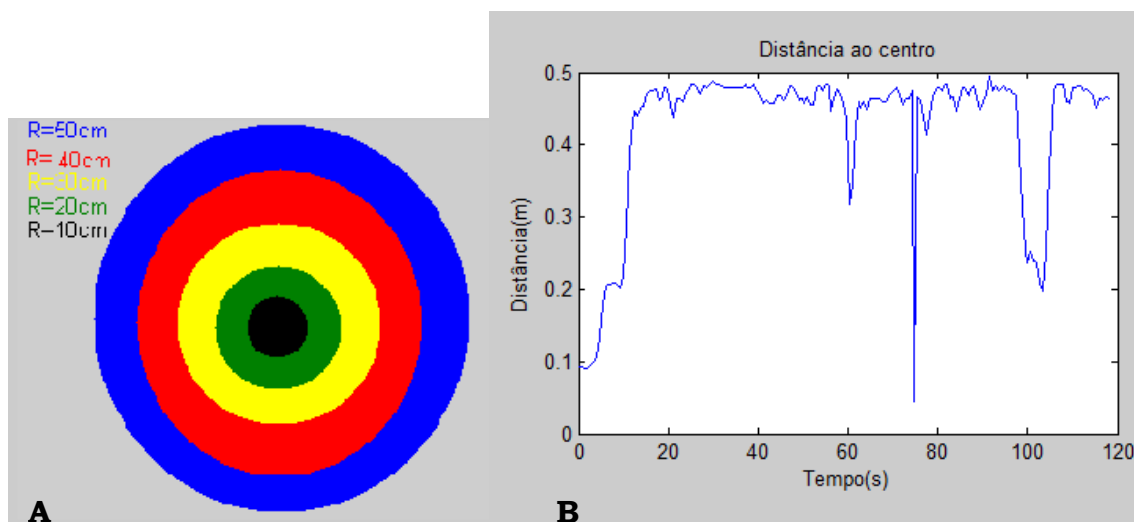


Figura 27. A, áreas no campo aberto. B, gráfico representando distâncias radiais do centro de massa do animal em relação ao centro do campo aberto.

4.3.2. Análise dos Resultados

Os dados foram representados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão, ou mediana (valores mínimos-valores máximos) e foram analisados estatisticamente através do software Sigmastat 3.0. Para se analisar os efeitos da desnutrição sobre a maioria dos parâmetros da atividade locomotora em diferentes idades, foram aplicados o teste ANOVA One Way para medidas repetidas, seguido do teste Holm-Sidak. Contudo, o número de paradas e a relação tempo/número de paradas, dados com distribuição não normal, foram analisados através do teste de Análise de Variância para medidas repetidas em Ranks, seguido do teste de Friedman. O estudo da trajetória nas áreas do campo aberto foi realizada através do teste ANOVA Three Way.

Na comparação intragrupo, houve aumento ($p<0.05$) progressivo do peso corporal (g) com a idade a partir do oitavo dia pos-natal no grupo C (Figura 28). Um aumento progressivo do peso corporal também pode ser observado no Grupo D ($p<0.05$), todavia a partir do 21º dia pós-natal (Figura 28). Na comparação entre intergrupo, o peso corporal dos desnutridos apresentou-se menor que os controles no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natal ($p<0.05$) (Figura 28).

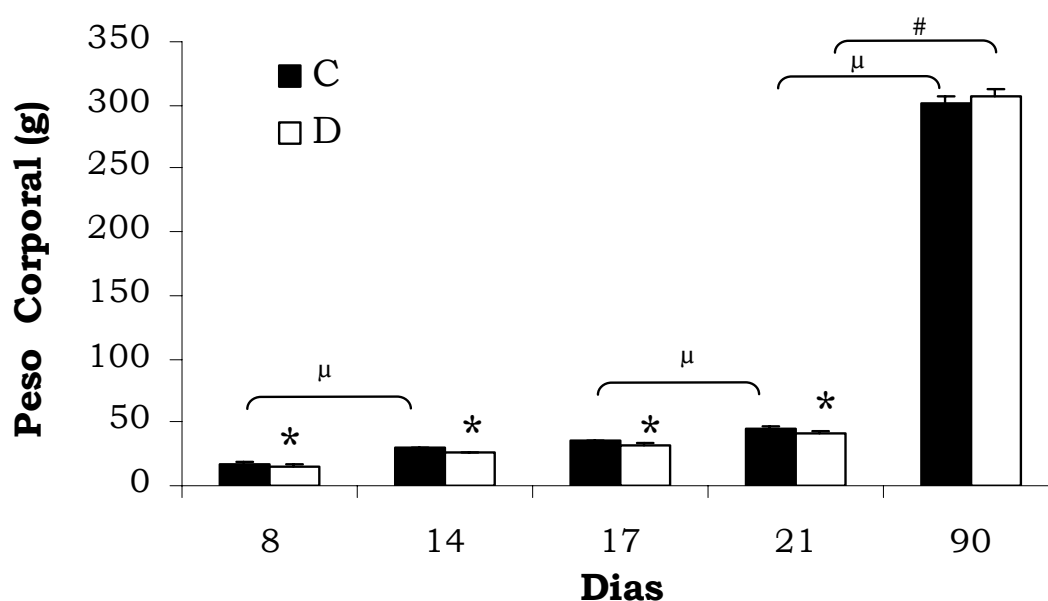


Figura 28 – Evolução ponderal (g) dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu=p<0,05$ (grupo C); $\#p<0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $*=p<0,05$.

A distância percorrida (m), na comparação intragrupo, aumentou ($p<0.05$) com a idade a partir do 14º dia de vida pós-natal nos animais do grupo C (Figura 29). O aumento ($p<0.05$)

da distância percorrida com a idade pode também ser observado no grupo D; todavia, já a partir do 8º dia de vida pós-natal (Figura 29). Na análise intergrupo, um aumento ($p<0.05$) na distância percorrida no 14º e no 17º dias pós-natal foi observado nos desnutridos quando comparado aos controles (Figura 29).

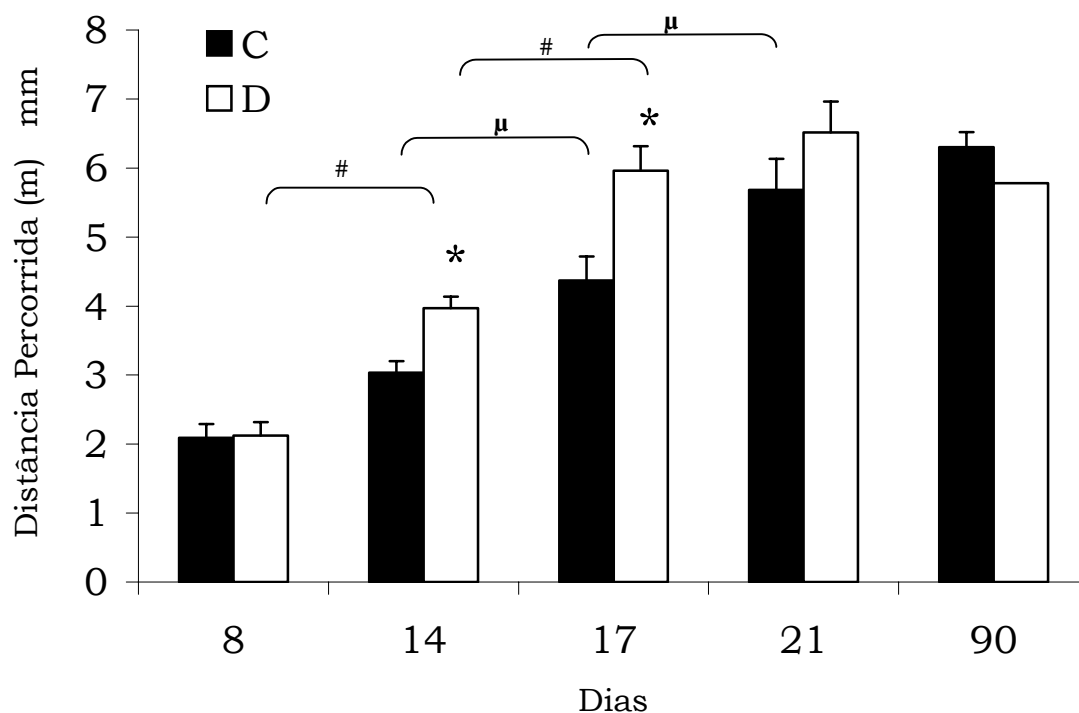


Figura 29– Evolução da distância percorrida (m) dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu=p<0,05$ (grupo C); $\#p<0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $* = p < 0,05$.

Na comparação intragrupo, a velocidade média (m/s) dos animais controles e desnutridos aumenta ($p<0.05$) com a idade (Figura 30). Nos animais controle, esse aumento pode ser observado no 14º dia pos-natal (Figura 30). Nos desnutridos, já pode ser observado aumento da velocidade média a partir do 8º dia de vida pos-natal (Figura 30). A comparação

intergrupos C e D revelou aumento ($p < 0.05$) da velocidade média nos desnutridos também aos 14° e 17° dias pós-natal (Figura 30).

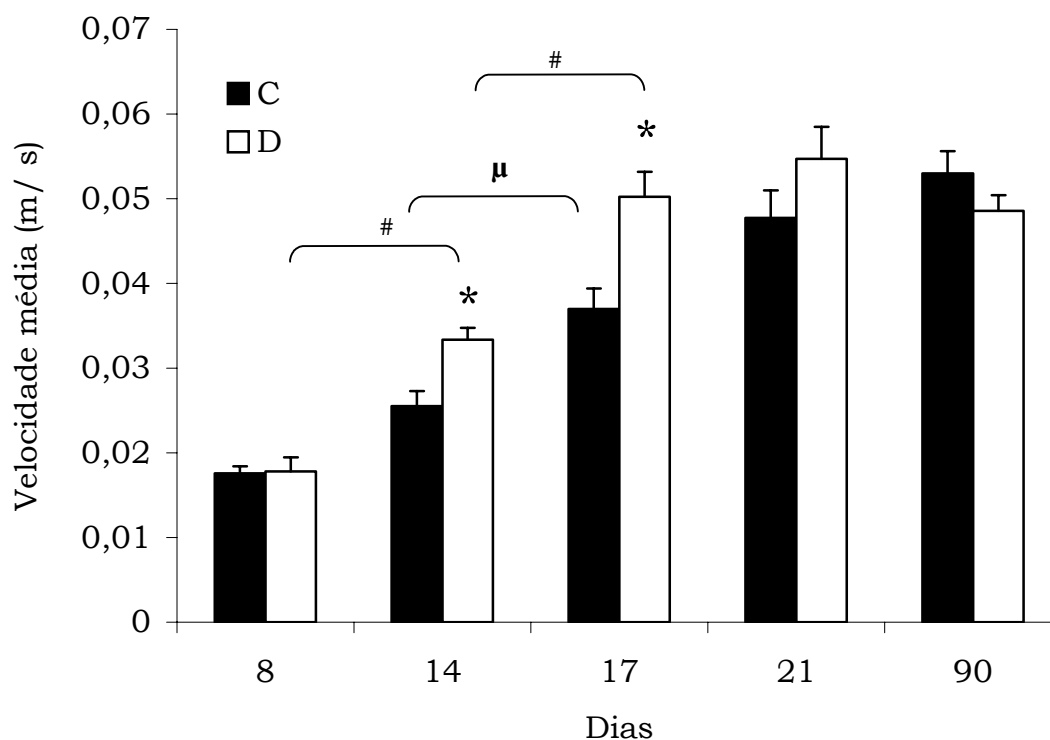


Figura 30 – Evolução da Velocidade Média (m/s) dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu = p < 0,05$ (grupo C); $\# = p < 0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $* = p < 0,05$.

A potência média (mW), na comparação intragrupos, aumentou nos animais adultos em relação aqueles aos 21 dias de vida tanto no grupo C quanto no grupo D ($p < 0.05$). Na comparação intergrupo, os animais desnutridos apresentaram um aumento da potência média em relação aos animais do grupo controle no 14° e 17° dias de vida ($p < 0.05$) (Figura 31).

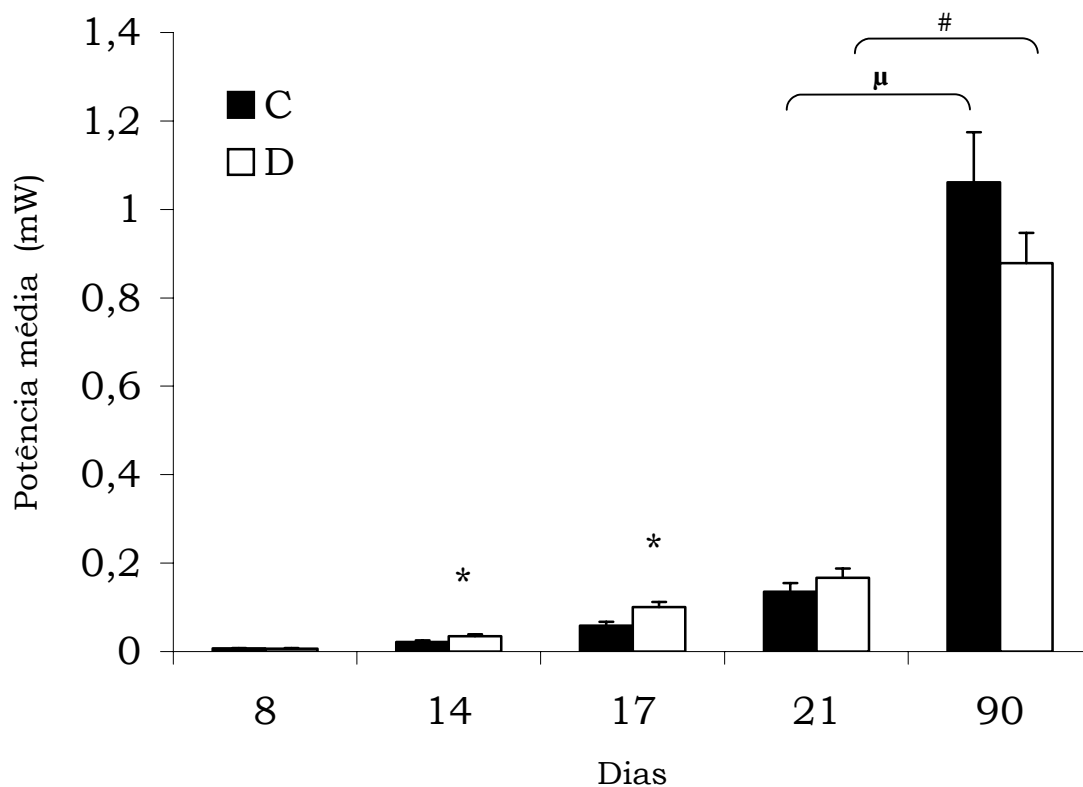


Figura 31. Evolução da Potência Média (mW) dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu=p<0,05$ (grupo C); $\#p<0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $*=p<0,05$.

Na comparação intragrupo, o tempo (s) em que o animal ficou parado durante o período de registro aumentou no grupo C com a idade até o 14º dia de vida pós-natal, diminuindo em seguida no meio do período correspondente ao período de lactação no rato (21 dias pós-natal) e voltando a aumentar nos animais adultos em relação aqueles aos 21 dias de vida ($p < 0.05$). O grupo D apresentou diminuição do tempo imóvel com a idade de forma progressiva até o 17º dia de vida pós-natal, havendo um aumento do tempo imóvel dos animais adultos em relação aqueles aos 21 dias de vida ($p < 0.05$). A comparação intergrupos revelou que os animais do grupo D apresentaram tempo de parada menor no 14º, 17º e 21º dias pós-natal comparados aos animais do grupo C ($p < 0,05$) (Figura 32).

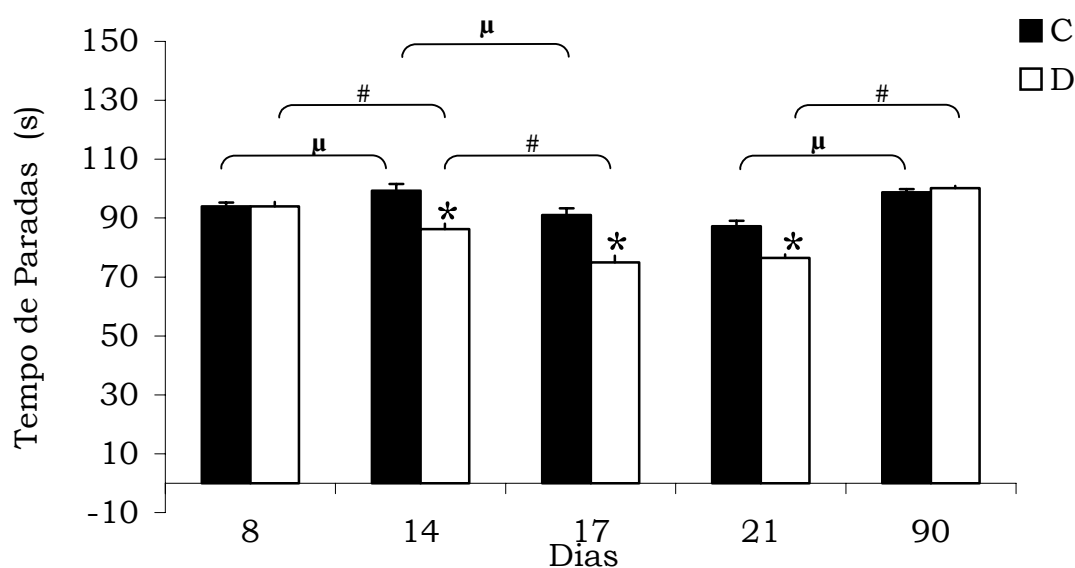


Figura 32- Duração de imobilidade (s) dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu = p < 0,05$ (grupo C); $\# = p < 0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $* = p < 0,05$.

A análise intragrupo da quantidade de vezes que o animal interrompeu sua movimentação revelou que tanto no grupo C quanto no grupo D houve aumento desse número de paradas nos animais adultos em relação aqueles aos 21 dias de vida ($p < 0.05$). Na comparação intergrupos, os animais desnutridos apresentaram aumento no número de paradas no 14º e 17º dias de vida em relação aos animais do grupo controle ($p < 0.05$) (Figura 33).

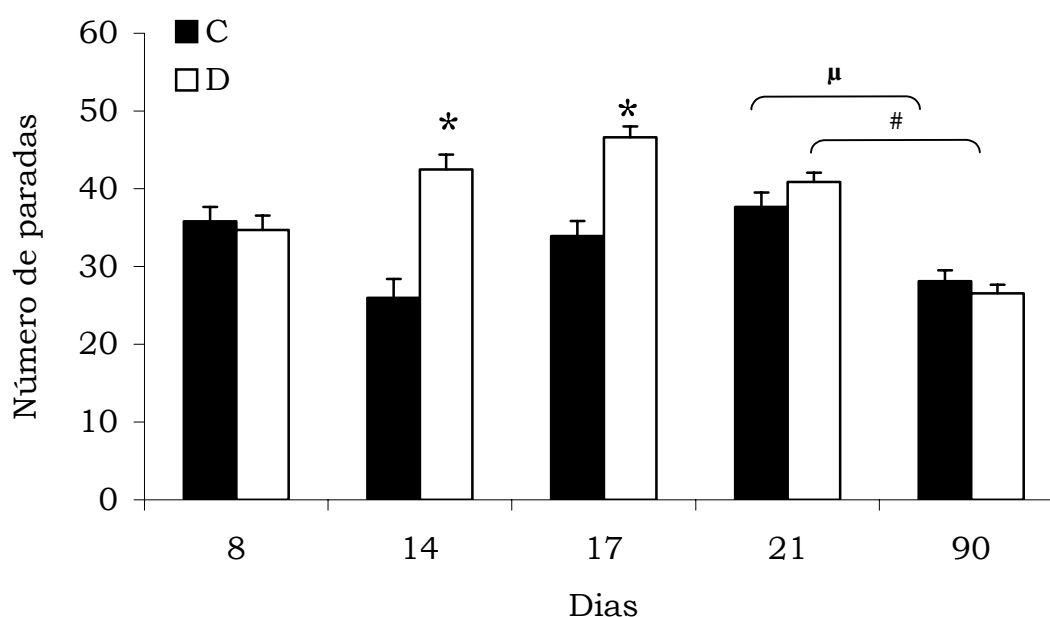


Figura 33- Número de paradas apresentadas pelos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu = p < 0,05$ (grupo C); $\# = p < 0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $* = p < 0,05$.

A análise da relação do tempo total parado sobre a quantidade de vezes que o animal interrompeu sua movimentação, na comparação intragrupo no grupo C, revelou que há diminuição dessa relação no 17º em relação ao 14º dia de vida pós-natal e posterior aumento

nos animais adultos comparados aqueles aos 21 dias de vida ($p < 0.05$). Quanto ao grupo D, houve aumento dessa relação nos animais adultos comparados aqueles aos 21 dias de vida ($p < 0.05$). Na comparação intergrupos, os animais desnutridos apresentaram aumento na relação tempo/número de paradas no 14º e 17º dias de vida em relação àqueles animais do grupo C ($p < 0.05$) (Figura 34).

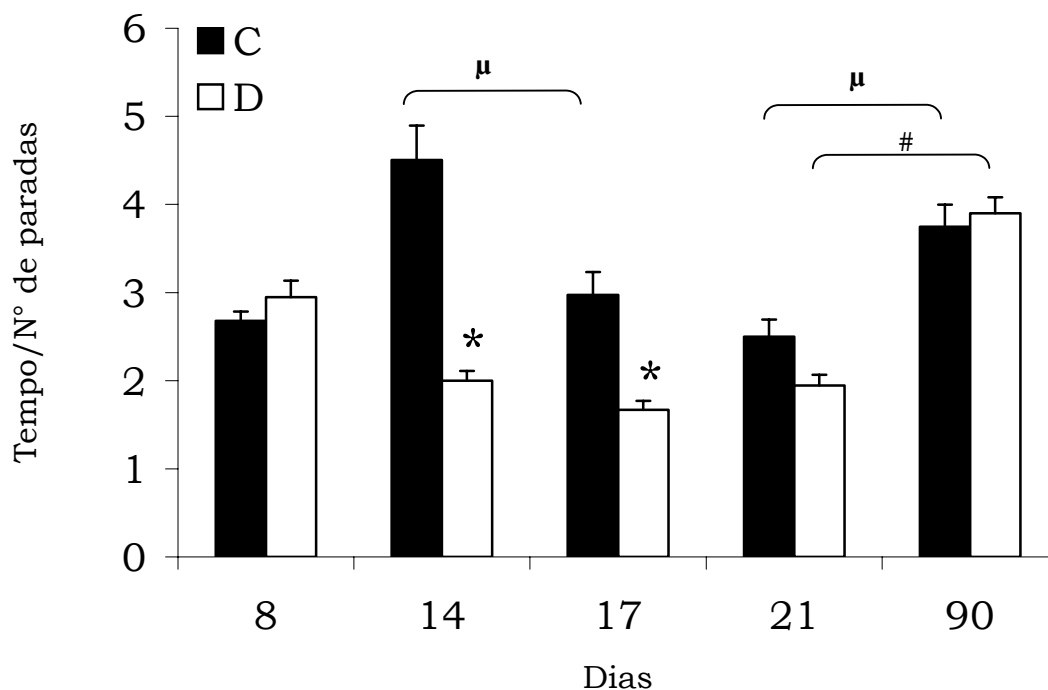


Figura 34- Duração média de imobilidade para cada parada dos ratos aos 8, 14, 17, 21 e 90 dias pós-natal. C, Grupo Controle; D, Grupo Desnutrido. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. Comparação intragrupos, ANOVA One-Way para medidas repetidas $\mu = p < 0,05$ (grupo C); $\# = p < 0.05$ (grupo D). Comparação intergrupos, ANOVA One Way para medidas repetidas $* = p < 0,05$.

Quanto a análise intragrupo da trajetória desempenhada pelos animais no campo aberto observou-se que os animais de ambos os grupos controle e desnutrido passam mais

tempo na área 1 comparado a área 2 durante todo o período correspondente a lactação dos ratos ($p<0.05$). No entanto, no 90° dia de vida, os animais de ambos os grupos experimentais passavam mais tempo na área 2 comparado a área 1 do campo aberto ($p<0.05$). Na comparação intergrupos C e D observou-se que os animais desnutridos passam menos tempo na área 1 comparado aos animais controle no 14° e 17° dia de vida e isso se inverte no 90° dia de vida ($p<0.05$). Os desnutridos também passam mais tempo na área 2 no 90° dia de vida ($p<0.05$) (Tabela 11).

A comparação intragrupo nas demais áreas do campo revela que os animais do grupo C passam mais tempo na área 2 comparada a área 3 no 8°, 14° e 21° dia de vida, porém, no 90° dia, isso se inverte e os animais controle passam mais tempo na área 3 comparada a área 2 ($p<0.05$). Os animais do grupo D, por sua vez, passam mais tempo na área 2 comparada a área 3 apenas no 8° dia, enquanto que no 14° e no 21° dia de vida, o desnutrido passa mais tempo a área 3 (área mais distante do centro) comparado à área 2 ($p<0.05$). Na comparação intergrupos os animais desnutridos comparados aos animais controle passam mais tempo na área 3 no 17° dia de vida ($p<0.05$) (Tabela 11).

Os animais do grupo C, na comparação intragrupo, passam mais tempo na área 3 comparada a área 4 no 8° dia de vida ($p<0.05$). No 17° dia, esses animais do grupo Controle passam mais tempo na área 4 comparados a área 3 ($p<0.05$). Os animais do grupo D, por sua vez, passam mais tempo na área 4 (mais distante do centro) comparado à área 3 no 8°, 17° e 90° dia de vida. Na comparação intergrupos, os animais desnutridos passam mais tempo na área 4 comparado aos animais controle no 14° e 17° dia de vida ($p<0.05$) (Tabela 11).

Os animais dos grupos C e D, na comparação intragrupo, passam mais tempo na área 5 comparada a área 4 no 14°, 17°, 21° e 90° dia de vida ($p<0.05$). Na área 5, a comparação intergrupos revela que os animais desnutridos passam mais tempo que os animais controle no

14° dia de vida e menos tempo na área 5 comparado aos controles no 90° dia de vida ($p < 0.05$)

(Tabela 11).

Tabela 11. Mediana (Valores mínimos-Valores máximos) do tempo em cada área do campo aberto durante a trajetória dos animais. C, grupo controle; D, grupo desnutrido $\delta p < 0,05$, A1 vs A2; $\infty p < 0,05$, A2 vs A3; $\theta p < 0,05$, A3 vs A4; $\Omega p < 0,05$, A4 vs A5; $*p < 0,05$, C vs D.

TEMPO(s)					
	8º dia	14º dia	17º dia	21º dia	90º dia
<i>Área 1</i>					
C	76,2 (21,2-119,3)	31,47 (2,65-90,1)	20,2 (5,3-98,7)	8,9 (0-81,5)	1,3 (0-6,6)
D	68,6 (22,5-117,3)	19,5 (0-62,9)*	8,0 (0-41,1)*	10,9 (0-51,0)	3,98 (0-17,9)*
<i>Área 2</i>					
C	41,08 (3,3-86,1) δ	22,2 (1,3-62,9) δ	9,6 (0,7-41,7) δ	7,0 (0,7-16,6) δ	3,6 (0-13,3) δ
D	19,5 (2,0-82,8) δ	10,3 (1,3-45,1) δ	7,0 (0,7-38,4) δ	5,0 (0,7-22,5) δ	8,3 (0,7-23,2) δ^*
<i>Área 3</i>					
C	0 (0-54,3) ∞	13,6 (2,0-59,0) ∞	4,6 (0,7-32,5)	4,6 (1,3-17,9) ∞	8,0 (2,0-31,1) ∞
D	0 (0-45,1) ∞	17,9 (0,7-47,0) ∞	11,3 (2,7-37,1)*	6,3 (0,7-21,9) ∞	11,6 (4,0-39,8)
<i>Área 4</i>					
C	0 (0-27,2) θ	10,9 (0-33,1)	7,3 (0,7-41,1) θ	10,6 (0,7-41,1)	21,5 (7,3-57,0)
D	0 (0-47,7) θ	18,6 (2,73-56,3)*	15,9 (4,6-36,4) θ^*	6,0 (0-26,5)	27,2 (9,3-50,3) θ
<i>Área 5</i>					
C	0 (0-2,65)	25,5 (0-66,3) Ω	61,6 (2,00-98,1) Ω	80,5 (5,7-98,1) Ω	83,1 (53,7-96,1) Ω
D	0 (0-0)	36,8 (0-106,7) Ω^*	67,3 (41,1-98,1) Ω	78,5 (31,8-111,3) Ω	64,6 (29,8-103,4) Ω^*

4.3.3. Discussão

Nossos achados mostraram que o ambiente pré-natal adverso leva ao desenvolvimento ponderal e locomotor anormal. No presente estudo, foi observado um déficit ponderal em ratos provenientes de mães submetidas à dieta pobre em proteínas durante a gestação no 8º, 14º, 17º e 21º dias de vida pós-natal. Como já mencionado e discutido em nossos estudos anteriores, há um grande número de evidências de redução do peso corporal após a desnutrição pré e/ou pós natal em ratos (Smart e Dobbing, 1971; Prakash et al., 1993; Brozanski et al. 1993; Toscano et al., 2008).

No presente estudo, os animais desnutridos durante o período gestacional houve aumento da velocidade média, da distância percorrida e da potência média. Associado a isso, houve déficit no tempo em que o animal permanecia parado, associado ao aumento nas paradas que esse animal realizava o que leva a uma diminuição importante da duração média por parada. O animal desnutrido se locomove mais, durante o tempo em que fica no campo aberto, diminuindo o tempo gasto nas paradas que realiza. Os animais desnutridos apresentam retardo na maturação somática e na ontogênese reflexa dos animais contribuindo para o desenvolvimento de padrões motores inapropriados (Barros et al., 2006; Anselmo et al. 2007). Em roedores é mostrado que a desnutrição pré e/ou pós-natal leva a danos estruturais e bioquímicos nas regiões cerebrais (Cintra et al., 1997; Cordero et al., 1985; De Bassio et al., 1996; Diaz-Cintra et al., 1990; Gopinath et al., 1976; de Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006). A desnutrição, durante esse período em ratos, diminui o peso cerebelar e número de células cerebelares, além de reduzir os neurônios do hipocampo (Cintra et al., 1997; De Bassio et al., 1996; Gopinath et al., 1976; de Souza et al., 2004; Bonatto et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrado em ratos desnutridos durante o desenvolvimento vários e

irreversíveis prejuízos comportamentais (Almeida et al. 1996a; Almeida et al., 1996b; Jaiswal et al., 1996; Moreira et al., 1997; Castro et al., 1987; Castro et al., 1993; Celedon et al., 1979; Cordoba et al., 1994). A desnutrição durante o período pré e pós natal aumenta o comportamento exploratório (Almeida et al., 1996; Duran et al., 2005), aumento da ansiedade e maior labilidade emocional (Sobotka et al., 1974; Teodósio et al., 1979; Jaiswal et al., 1996) e déficit na memória dos animais (Cordoba et al., 1994). Essas alterações comportamentais poderiam influenciar de forma negativa a aquisição de um padrão locomotor normal. Autores referem que desnutridos apresentam comportamentos motores diferentes (Teodósio et al., 1979; Barros et al., 2006). Os autores descreveram tais alterações como uma consequência de modificações no comportamento emocional, com exacerbação de respostas antecipatórias relacionadas ao stress (Teodósio et al., 1979; Jaiswal et al., 1996). O rato mostrou aumento na movimentação voluntária, mas sem propósitos definidos (Teodósio et al., 1979; Duran et al., 2005). Estes achados poderiam explicar o fato de termos encontrado uma diminuição no tempo de repouso de ratos desnutridos. Os animais desnutridos durante a gestação são hiperativos durante o período pos-natal precoce.

Autores têm se dedicado ao estudo da trajetória dos animais durante sua atividade locomotora num campo aberto (Lukoyanov et al., 1999; Yaski et al., 2008). As diferenças observadas na evolução da habilidade motora dos animais desnutridos podem estar relacionadas às deficiências no comportamento do animal (Khana et al., 1994; Hall, 1984). A partir da segunda semana pos-natal, os animais desnutridos buscam as paredes do campo aberto, percorrendo mais as áreas periféricas do campo aberto. Estudos revelam que os animais controles visitam e permanecem na zona central (área 1) do campo (Yaski et al., 2008). Essas alterações também podem estar relacionadas ao aumento da distância percorrida, velocidade e potência e no número de paradas e diminuição no tempo total parado no 14º dia e 17º dia de vida pós-natal. Além disso, autores referem que animais desnutridos apresentam

aumento da deambulação na parte periférica no labirinto (Castellano et al., 1976; Lukoyanov et al., 1999). Essa tendência do animal procurar as bordas do campo aberto indica elevado nível de reatividade emocional (Lukoyanov et al., 1999). A diminuição do tempo na área central do campo é um indicativo de ansiedade (Prut e Belzung, 2003). Animais que procuram as bordas do campo aberto são mais ansiosos. Outro aspecto importante é que nessa idade a abertura dos olhos irá influenciar os movimentos dos animais (Fox, 1965; Geisler et al., 1993). Antes da abertura dos olhos, os movimentos de cabeça eram realizados somente durante as pausas na locomoção, já quando a visão aparece os ratos podem examinar com cuidado o ambiente com os movimentos de cabeça enquanto caminham (Geisler et al., 1993). Assim, conforme mencionado, animais desnutridos durante a gestação apresentam retardo na abertura ocular (os animais desnutridos abriram os olhos por volta do 15º dia de vida, enquanto o controle por volta do 13º dia de vida pós-natal) e isso pode influenciar as diferenças observadas entre os animais controles e desnutridos.

Na terceira semana de vida o rato controle atinge um padrão locomotor próximo do animal adulto (Westerga e Gramsbergen, 1990). A hiperatividade observada nos animais desnutridos na segunda semana de vida pos-natal, já não é mais observada. Esses dados estão de acordo os valores semelhantes de velocidade média, distância percorrida e potência desempenhados pelos animais desnutridos na mesma idade. Autores referem, porém, que a hiperatividade no campo aberto é observada somente quando este é novidade, desaparecendo quando se torna familiar (Holson e Walker, 1986). Embora, outros autores demonstrem que a desnutrição perinatal promove o déficit na memória de animais adultos, mesmo após um longo período de recuperação (Cordoba et al., 1994; Castro et al, 1987; Celedon et al., 1979; Goodlett et al., 1986). A medida que vão atingindo o padrão adulto os animais tornam-se menos ativos, não se pode afirmar, no entanto, se a desnutrição não causou alterações nos processos de memória do animal. Além disso, autores afirmam que a desnutrição em ratos

leva a diminuição da atividade locomotora (Barros et al., 2006; Bellinger et al., 2006). Outro aspecto importante é que a desnutrição pode retardar a ontogenese reflexa, fazendo com que reflexos primitivos sejam mantidos, prejudicando a aquisição de padrões motores maduros (Barros et al., 2006; Anselmo et al., 2006).

Na idade adulta os desnutridos permanecem mais tempo no centro do campo. Mais estudos são necessários sobre a neurobiologia dessas alterações comportamentais. Outros comportamentos têm sido relatados ter origem perinatal nos roedores. Meaney e colaboradores (2001) mostram que o padrão de cuidado materno é um mediador dos efeitos adversos do ambiente sobre o desenvolvimento neural. Esses autores referem que a resposta materna ao ambiente que lhe é imposta durante o período neonatal conduz a respostas adaptativas que refletem na qualidade do cuidado materno para com sua prole. Isso programa a reatividade ao estresse e o padrão comportamental associado da prole e influencia a relação entre a mãe e seus filhotes nas gerações futuras. Corroborando os achados do presente estudo, autores referem que animais desnutridos durante a gestação apresentam-se menos ativos que a prole normal na idade adulta (Vickers et al., 2003). Segundo esses autores o comportamento sedentário é determinado durante o período pré-natal. No entanto, mais estudos são necessários para se compreender como uma agressão pré-natal poderia comprometer o estilo de vida dos animais. A influência pré-natal parece ocasionar mudanças permanentes na prole conforme observado na tendência do animal adulto desnutrido no período crítico do desenvolvimento permanecer mais nas áreas mais centrais do campo aberto mesmo após o restabelecimento de uma dieta adequada durante a vida pós-natal.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

RESUME EN FRANÇAIS

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il existe un grand nombre d'étude ayant montré une association directe entre diminution de croissance fœtale et néonatale et risque élevé de développer des pathologies d'origine métabolique à l'âge adulte (Forsdall et al., 1978 ; Barker et al., 1989 ; Hales, 1991 ; Hales e Barker, 1992). Pour expliquer ce phénomène, l'hypothèse de l'influence phénotypique fut proposée, hypothèse selon laquelle « un organisme s'adapte à un environnement intra-utérin inapproprié en optimisant l'utilisation des nutriments afin d'assurer sa survie » (Hales e Barker, 1992). Après cette période de dénutrition, si l'alimentation devient adéquate et plus abondante, un conflit entre programmation métabolique et les nouvelles conditions nutritionnelles peuvent conduire à l'obésité, l'hypertension ou la résistance à l'insuline (Lucas, 1991, Hales e Barker, 1992). De plus, il est à noter que la dénutrition intra-utérine est à l'origine de réorganisations structurelles et fonctionnelles de nombreux systèmes physiologiques tel le système musculo-squelettique.

En effet, le système musculaire, étudié à travers ses caractéristiques typologiques et biomécaniques a montré un certain degré d'adaptation à la dénutrition fœtale. Ainsi, nous avons observé, suite à la dénutrition fœtale, une augmentation du pourcentage de fibres IIa dans le soleus, muscle postural, alors que l'EDL, muscle non postural, subit une augmentation de fibre de type IIb au détriment du pourcentage de fibre IIa chez les animaux de 25 et 90

jours. En plus, nous avons montré différents effets de la dénutrition foetale sur les caractéristiques contractiles ainsi que sur les caractéristiques élastiques de la CES et de la CEP des muscles soleus et EDL à 25 jours. Cependant, il est intéressant de noter que de nombreuses altérations enregistrées chez les animaux de 25 jours disparaissent partiellement ou totalement à l'âge adulte. Quoiqu'il en soit, les modifications des propriétés mécaniques chez le jeune rat auront une influence sur le développement ultérieur de la posture et de la locomotion, modification qui à son tour pourra influencer au moins en partie les caractéristiques biomécaniques musculaires, d'autant plus qu'il a été montré des conséquences sur le plan comportemental (timidité et anxiété accrues, implication et persévérance altérée) (Barrett et al, 1985; Almeida et al, 1996a) pouvant augmenter la propension à l'hypoactivité des animaux dénutris à l'âge adulte (Vickers et al., 2003). Il peut exister une certaine réciprocity entre adaptation mécanique et modification de l'activité locomotrice. Néanmoins, la persistance de certaines altérations des propriétés biomécaniques peut laisser supposer que l'adaptation intra-utérine du système musculo-squelettique, pour faire face à l'agression précoce, est permanente. Ce dernier mécanisme associé à ces effets de la dénutrition corrobore l'hypothèse de "programming", c'est-à-dire qu'une agression nutritionnelle au cours d'une période critique de développement peut provoquer des effets permanents de la structure et la fonction des organes.

Des retards en conséquence de la dénutrition foetale sur la maturation somatique sont observés dans ce travail. Un déficit du taux de croissance des animaux observé à travers la diminution des paramètres de croissance somatique peut alors influencer sa performance motrice. De plus, le retard dans l'apparition des structures physiques utilisées pour l'exploration (conduit auditif, ouverture des yeux) peut altérer les relations du dénutri avec l'environnement externe et augmenter le risque de mortalité.

La dénutrition induit un retard dans le développement des réflexes primitifs. Ceci démontre que la structure nerveuse est affectée par cette agression. Ces réflexes sont intégrés dans les comportements volontaires développés plus tardivement, et sont les unités de base de la coordination à partir desquels seront possibles les organisations plus complexes du comportement. Ainsi, le retard de l'apparition de l'expérience sensorimotrice associé au retard des réflexes pourra alors être préjudiciable sur l'acquisition de tâches motrices dans des étapes postérieures. Ainsi, la dénutrition fœtale pourra induire des altérations durables sur l'activité locomotrice. En effet, nous avons montré dans notre étude que la dénutrition intra-utérine a entraîné après 14 jours une hyperactivité chez le rat. De la même façon, cette hyperactivité supposée être associée à la peur pendant la période néonatale a semblé entraîner des préjudices dans la construction des activités exploratoires et cognitives. En effet, cette dernière proposition est corroboré par l'hypoactivité enregistré chez les rat adulte dénutrie pendant la période de développement fœtale.

CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude permettent de conclure que :

- ❖ La dénutrition intra-utérine entraîne des altérations postnatales des caractéristiques biomécaniques des muscles soleus postural et EDL non postural associé a des modifications des propriétés typologiques, métaboliques, structurales et ioniques.
- ❖ Les altérations des caractéristiques mécaniques musculaires sont différentes selon le type de muscle.

- ❖ La persistance des certaines altérations des caractéristiques structurales et biomécaniques démontre que l'adaptation intra-utérine du système musculo-squelettique, pour faire face à l'agression précoce, a des conséquences permanentes.
- ❖ Les altérations des caractéristiques biomécaniques musculaires ont des répercussions durables sur l'expression de la fonction du système musculo-squelettique, c'est-à-dire sur l'activité locomotrice. Et réciproquement, les modifications de l'activité locomotrice chez ces animaux peut aussi, en partie, avoir des effets sur les caractéristiques biomécaniques musculaires
- ❖ La dénutrition intra-utérine induit un retard dans la maturation somatique et principalement dans le développement des réflexes primitifs. L'expression du fonctionnement de l'arc réflexe est retardée par l'agression, indiquant un préjudice dans le développement de la structure nerveuse.
- ❖ Le retard de l'apparition de l'expérience sensorimotrice associé au retard des réflexes primitifs est préjudiciable pour l'acquisition des tâches motrices adultes
- ❖ La dénutrition intra-utérine induit des altérations durables de l'activité locomotrice avec une hyperactivité apparemment associée à la peur pendant la période néonatale et une hypoactivité à l'âge adulte.

DISCUSSÃO GERAL

Um grande número de evidências epidemiológicas e experimentais indica que existe uma associação direta entre baixo crescimento fetal e neonatal e uma elevada susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (Ravelli et al., 1977 ; Forsdall et al., 1978 ; Barker et al., 1988 ; Hales et al., 1989 ; Hales e Barker, 1992). Para explicar essa relação, foi lançada a hipótese da influência fenotípica (*Thrifty phenotype hypothesis*) propondo que “o organismo se adapta a um *milieu intrauterino* adverso otimizando a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência” (Hales e Barker, 1992). Em seguida, contudo, se a alimentação torna-se adequada ou mesmo abundante, o conflito entre a programação metabólica (Lucas, 1991) e as novas condições nutricionais pode levar aquele organismo à obesidade, resistência à insulina e hipertensão (Hales e Barker, 1992). O estado nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento tem sido considerado um importante indutor da programação metabólica nos animais e no homem. Em ratos a restrição protéica materna durante a gestação e lactação, além de levar a um déficit na taxa de crescimento da prole, aumenta o dano oxidativo e altera o metabolismo glicose/insulina nos animais adultos (Desai et al., 2007 ; Ozanne et al., 1998 ; Ozanne et al., 2005). Em humanos, vários estudos epidemiológicos têm reforçado a associação entre o baixo peso ao nascer e doenças metabólicas na idade adulta (Hales e Barker, 1992 ; Phillips et al., 1994 ; Yajnik, 2000). Mecanismos epigenéticos como metilação de DNA, induzida pela desnutrição durante a gestação, o ambiente, ou fatores hormonais podem levar a um maior risco para doenças metabólicas na prole adulta (Moura e Passos, 2005). Essa explicação ajuda a compreender o mecanismo pelo qual a restrição protéica durante a gestação muda de forma permanente a estrutura e função dos órgãos e sistemas (Lisboa et al., 2008). A desnutrição intra-uterina

acarreta danos importantes na estrutura corporal do neonato o que foi também constatado no presente trabalho. Enfim, esta tese globalmente tende a corroborar nesse sentido a hipótese da influência fenotípica e o papel da nutrição no desenvolvimento fisiológico. Ademais, juntam-se às evidências da programação metabólica em consequência da desnutrição intra-uterina, evidências de reorganização estrutural e funcional dos sistemas fisiológicos, entre os quais o músculo-esquelético.

Muitos elementos estão envolvidos no desenvolvimento locomotor e dificilmente todos os elementos deste processo poderiam ser analisados. Diante disso, foram empregados métodos que permitiram a avaliação do crescimento do animal e de suas propriedades mecânicas musculares bem como de seu desenvolvimento comportamental através da análise da maturação reflexa no período neonatal e da evolução de sua atividade locomotora até a idade adulta. Inicialmente, podemos afirmar que o conjunto dos achados do presente trabalho demonstra que a desnutrição intra-uterina leva a alterações estruturais e funcionais persistentes de músculos posturais e não-posturais.

Assim, as alterações estruturais demonstradas, nesse trabalho, em decorrência da desnutrição intra-uterina, são associadas à tipologia das fibras. Foi observado que a desnutrição fetal, aumenta a proporção de fibras rápidas IIa no solear (músculo postural) que persiste até a idade adulta no desnutrido. Contudo, o EDL (músculo não-postural) mostram uma redução das fibras IIa e aumento das fibras IIb que persiste até a idade adulta no desnutrido. Além disso, houve diferentes efeitos da desnutrição fetal sobre as características contráteis, assim como nas características elásticas do CES e do CEP nos músculos solear e EDL aos 25 dias. No entanto, é interessante notar que várias alterações observadas nos animais aos 25 dias desaparecem parcialmente ou totalmente na idade adulta. Essas modificações das propriedades mecânicas no jovem terão repercussões sobre o desenvolvimento posterior da postura e da locomoção. Essas modificações na locomoção, por

sua vez, poderão influenciar ao menos em parte as características biomecânicas musculares, uma vez que foram mostradas conseqüências comportamentais (aumento da ansiedade e indecisão, perseverança e comprometimento alterado) (Barrett et al., 1985, Almeida et al., 1996) que podem aumentar a propensão a hipoatividade dos animais desnutridos.

É plausível que mudanças nas propriedades mecânicas musculares podem influenciar a atividade locomotora. Durante o desenvolvimento da atividade locomotora, uma seqüência de eventos e comportamentos são necessários para a evolução do padrão postural e locomotor normal, porém se o sistema músculo-esquelético apresenta modificações em sua estrutura e propriedades, essa seqüência poderá ser modificada. Além disso, a persistência de certas alterações das propriedades biomecânicas sugere que a adaptação (“programming” em sentido mais amplo) intra-uterina do sistema músculo-esquelético, para fazer face à agressão precoce, tem conseqüências permanentes, mais uma vez corroborando a hipótese da influência fenotípica.

Retardo em decorrência da desnutrição intra-uterina sobre o desenvolvimento somático foi observado no presente trabalho. O déficit na taxa de crescimento do animal observado através das medidas murinométricas reduzidas certamente influencia o seu desempenho motor. Animais menores apresentarão um comportamento locomotor diferente de seus controles. Ademais, nas análises da maturação das características físicas observamos retardo na abertura do conduto auditivo, na erupção dos dentes incisivos, e na abertura dos olhos. Estas estruturas utilizadas para exploração cognitiva são importantes na relação do rato com seu meio ambiente, o retardo verificado prejudica a interação dos desnutridos com o ambiente externo e diminui as chances de sobrevivência.

A desnutrição intra-uterina induziu retardo importante no desenvolvimento pós-natal dos reflexos primitivos. Esta evidência constatada nesse trabalho demonstra que o arco reflexo é afetado pela agressão nutricional, repercutindo sobre a expressão funcional; ou seja,

o ato reflexo. O padrão de locomoção se desenvolve segundo uma seqüência cronológica e depende da integridade do sistema motor (sistema nervoso central e músculo-esquelético) no rato (Fox, 1965; Gramsbergen, 1998). Esses reflexos são integrados aos comportamentos voluntários desenvolvidos mais tarde, e são as unidades de base da coordenação a partir dos quais serão possíveis as organizações mais complexas dos comportamentos. Portanto, o atraso no aparecimento da experiência sensório-motora associada ao funcionamento dos reflexos primitivos poderá ser então prejudicial na aquisição das funções motoras em etapas mais tardias do desenvolvimento. Desta forma, o retardo na ontogênese reflexa no neonato desnutrido reduz sua experiência num período onde as informações sensório-motoras deveriam estar chegando ao córtex sensorial e motor. A pobreza de informações ao córtex cerebral está associada ao retardo da velocidade de condução nervosa (Da-Silva et al., 1987; Segura et al., 2004). O atraso no desenvolvimento das funções motoras inviabiliza o desempenho adequado das habilidades esperadas num estágio posterior do desenvolvimento, quando a movimentação independente e orientada contribuirá para integração do animal com o ambiente. No homem, o prejuízo na interação contínua com o meio ambiente desde o nascimento compromete o aprendizado, podendo haver repercussões na função cognitiva.

Corroborando essa hipótese, nós demonstramos que a desnutrição intra-uterina induz alterações por vezes persistentes na atividade locomotora. O estudo do desenvolvimento da atividade locomotora a partir da análise da trajetória demonstrou que a desnutrição intra-uterina provoca, durante a segunda semana do período do aleitamento, período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso, uma hiperatividade no rato. Do mesmo modo, esta hiperatividade durante o período neonatal aparentemente associada ao medo ou labilidade emocional (Teodósio et al., 1979; Jaiswal et al., 1996), pode acarretar prejuízos na construção das atividades exploratórias e cognitivas. Esta proposição parece plausível, pois na idade adulta este rato desnutrido deixq de ser hiperativo.

Finalmente, a motricidade é, sem dúvida, uma atividade inerente aos mamíferos, permitindo-lhes tanto ajustar sua postura em função de suas necessidades de relacionamento com o mundo, como se movimentar de forma a se afastar de ambientes hostis, e ainda buscar locais que lhes favoreçam a sobrevivência, ou simplesmente explorar o meio que os cercam. Como constatamos, os ratos submetidos à desnutrição intra-uterina apresentam hiperatividade neonatal, porém quando atingem o padrão locomotor adulto deixa de ser hiperativo. Esses animais demoram a iniciar suas atividades, dispensando mais tempo nas áreas mais centrais do campo-aberto. Assim, a desnutrição perinatal parece também programar alterações comportamentais nos animais, havendo uma tendência a lentidão do comportamento locomotor. Há evidências da existência de plasticidade durante o desenvolvimento, definida como a habilidade do genótipo em produzir mais de uma forma alternativa de estrutura, estado fisiológico e/ou comportamento, em resposta às condições do meio ambiente (Sayer et al., 1998). Corroborando nossos achados, outros autores referem que animais desnutridos durante a gestação apresentam-se menos ativos que seus controles na idade adulta, mesmo após o restabelecimento de uma dieta normal ao longo da vida pós-natal (Vickers et al., 2003). Portanto, se o comportamento sedentário é determinado durante o desenvolvimento pré-natal, as implicações da comprovação dessa hipótese são profundas para o entendimento dos padrões adultos da locomoção e para o esforço da saúde pública em se aumentar a prática de exercícios físicos nos adultos com hipertensão, resistência insulina e hiperlipidemia.

CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo permitem concluir que:

- ❖ A desnutrição intra-uterina leva a modificações pós-natais das características biomecânicas do músculo solear (postural) e EDL (não-postural) associada a modificações das propriedades tipológicas, metabólicas, estruturais e iônicas.
- ❖ As alterações das características mecânicas musculares são diferentes segundo o tipo de músculo.
- ❖ A persistência de certas alterações das características estruturais e biomecânicas demonstram que a adaptação intra-uterina do sistema músculo-esquelético diante da agressão precoce tem conseqüências permanentes.
- ❖ As alterações das características biomecânicas musculares têm repercussões duráveis sobre a expressão da função do sistema músculo-esquelético, ou seja, sobre a atividade locomotora. E reciprocamente, as modificações da atividade locomotora nos animais podem também, em parte, ter efeitos sobre as características biomecânicas musculares.
- ❖ A desnutrição intra-uterina leva ao retardo na maturação somática e principalmente no desenvolvimento dos reflexos primitivos. A expressão do funcionamento do arco reflexo é retardado pela agressão, indicando prejuízo no desenvolvimento da estrutura nervosa.
- ❖ O retardo na aparição da experiência sensório-motora prejudica a aquisição do desempenho motor no adulto.

- ❖ A desnutrição intra-uterina leva a alterações duráveis da atividade locomotora com uma hiperatividade aparente associada ao medo durante o período neonatal e hiperatividade na idade adulta.

6. PERSPECTIVAS

RESUME EN FRANÇAIS

PERSPECTIVES

Afin de répondre aux hypothèses proposées dans ce travail, il peut être envisagé :

- ❖ D'analyser les répercussions de la dénutrition intra-utérine sur le contenu de collagène musculaire, sur l'ultrastructure musculaire ainsi que sur les protéines sarcomériques comme la titine et d'observer les relations possibles de ces changements sur l'élasticité musculaire passive.
- ❖ D'évaluer les caractéristiques de la partie passive de le CES par une étude des propriétés mécaniques du tendon suite à la dénutrition foetale
- ❖ De réaliser une étude épigénétique par évaluation de l'expression des gènes mis en jeu dans la synthèse et la dégradation des protéines musculaires suite à l'agression nutritionnelle pendant la gestation.
- ❖ D'étudier les effets de la dénutrition intra-utérine sur les hormones thyroïdiennes et sur le métabolisme de l'insuline et indiquer leurs effets possibles sur la proportion des types de fibres musculaires.
- ❖ D'étudier les effets d'autres types d'agressions nutritionnelles, par exemple, par une diète pauvre en micronutriments sur le développement de l'activité locomotrice.
- ❖ D'étudier l'effet de la dénutrition intra-utérine sur l'activité locomotrice à plus long terme et au cours de la sénescence.

- ❖ D'étudier l'effet de la dénutrition foetale sur la propension à l'hypoactivité et l'effet bénéfique de l'exercice physique sur les animaux à l'âge adulte.
- ❖ D'analyser les effets de la dénutrition foetale sur les changements du comportement des animaux, comme l'anxiété.

PERSPECTIVAS

A fim de responder as hipóteses propostas nesse trabalho, vislumbramos:

- ❖ Analisar as repercussões da desnutrição intra-uterina sobre o conteúdo de colágeno muscular, sobre a ultraestrutura muscular, assim como sobre as proteínas sarcoméricas como a titina e de observar as relações possíveis dessas modificações sobre a elasticidade muscular passiva.
- ❖ Avaliar as características da parte passiva do componente elástico em série através do estudo das propriedades mecânicas do tendão, após a desnutrição fetal.
- ❖ Realizar estudo epigenético, avaliando genes que expressam as proteínas musculares e as agressões nutricionais durante a gestação.
- ❖ Estudar os efeitos da desnutrição intra-uterina sobre os hormônios tireoideanos e sobre o metabolismo da insulina, relacionando as eventuais repercussões sobre as proporções dos tipos de fibras musculares.
- ❖ Estudar os efeitos de outras agressões nutricionais, por exemplo, dietas pobres em micronutrientes sobre o desenvolvimento da atividade locomotora.
- ❖ Estudar o efeito da desnutrição intra-uterina sobre a atividade locomotora durante a senescência.
- ❖ Estudar o efeito do exercício físico sobre a tendência a hipoatividade na idade adulta de animais desnutridos precocemente.
- ❖ Analisar modificações comportamentais, como a ansiedade, após desnutrição intra-uterina em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiol Rev**, v. 85, n.2, p. 523-569, 2005.
2. ADLARD, B.P.F.; DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. **Brain Res.** 1971; 30:198-199.
3. ADAMS, G.R. MCCUE, S.A., ZENG, M., BALDWIN, K.M. Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4, p. R954-61, 1999.
4. AGBULUT, O.; NOIREZ, P., BEAUMONT, F. ; BUTLER-BROWNE, G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. **Biol Cell**, v. 95, n. 6, p. 399-406, Sep, 2003.
5. ALBUQUERQUE, K.T.; SARDINHA, F.L.; TELLES, M.M.; WATANABE, R.L.; NASCIMENTO, C.M.;TAVARES DO CARMO, M.G.; RIBEIRO, E.B. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. **Nutrition**. 22(7-8):820-9. 2006.
6. ALMEIDA,S.S.;TONKISS, J.;GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav.** 60(2):675-80. 1996a.
7. ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. **Physiol Behav.** 60(1):197-201. 1996b.
8. ALMEIDA-SILVEIRA, M.I.; PEROT, C. ; POUSSON, M. ; GOUBEL, F. Effects of stretch-shortening cycle training on mechanical properties and fibre type transition in the rat soleus muscle. **Pflugers Arch**, v. 427, n. 3-4, p. 289-294, 1994.
9. ALNAQEEB, M.A., AL ZAID, N.S., GOLDSPINK, G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. **J Anat**, 139:677-89, 1984.
10. ALTAMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Anim Behav**, v. 23, n. 4, p. 896-920, 1975.

11. ALVES, A.P.; DÂMASO, A.R.; DAL PAI, V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J Pediatr (Rio J)**. v.84, n.3, p.264-71, 2008.
12. ANDERSON, J.; LI, Z.; GOUBEL, F. Passive stiffness is increased in soleus muscle of desmin knockout mouse. **Muscle Nerve**; v.4, n.8, p.1090-2, 2001.
13. ANDERSON, J. ; LI, Z.; GOUBEL, F. Models of skeletal muscle to explain the increase in passive stiffness in desmin knockout muscle. **J Biomech**. v.35, n.10, p.1315-24, 2002.
14. ANGIOLONI, E. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. **Placenta**, v. 27, Suppl A, p. S98-102, 2006.
15. ANSELMO, C.W.S.F.; SANTOS, A.A.A.; FREIRE, C.M.A.; FERREIRA, L.M.P.; CABRAL-FILHO, J.E.; CATANHO, M.T.J.A. MEDEIROS, M.C. Influence of 60Hz, 3μT, electromagnetic field on the reflex maturation of wistar rats offspring from mothers fed a regional basic during pregnancy. **Nutritional Neuroscience**; 9(5/6): 201-206, 2006.
16. ARRUDA, A.P.; OLIVEIRA, G.M.; CARVALHO, D.P.; DE MEIS, L. Thyroid hormones differentially regulate the distribution of rabbit skeletal muscle Ca²⁺-ATPase (SERCA) isoforms in light and heavy sarcoplasmic reticulum. **Mol Membr Biol** v.22, p.529 –37, 2005.
17. BAGNI, M. A. CECCHI, G. ; COLOMO, F. ; GARZELLA, P.. Are weakly binding bridges present in resting intact muscle fibers? **Biophys J**, v. 63, n. 5, p. 1412-1415, 1992.
18. BAGNI, M.A. ; CECCHI, G. ; COLOMBINI, B. ; COLOMO, F. Mechanical properties of frog muscle fibres at rest and during twitch contraction. **J Electromyogr Kinesiol**. V.9, n.2, p.77-86, 1999.
19. BAGNI, M.A.;CECCHI, G.;COLOMO, F.;GARZELLA, P. Absence of mechanical evidence for attached weakly binding cross-bridges in frog relaxed muscle fibres. **J Physiol**. V. 15, n.482 (Pt 2), p.391-400, 1995.
20. BALDWIN, K.M.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **J Appl Physiol**, v. 90, n. 1, p. 345, 357, 2001.

21. BARBET, J.P.; BUTLER-BROWNE, G.S. ; LABBE, S. ; MAILLET, M. ; POMPIDOU, A. Quantification of the diameter of muscular fibres in the course of the development of the quadriceps. **Bull Assoc Anat (Nancy)**, v. 75, n. 230, p. 25-29, 1991.

22. BARKER, D. J.; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. **J Epidemiol Community Health** , v. 40, n. 1, p. 37-44, 1986.

23. BARKER, D. J.; OSMOND, C. ; GOLDING, J., KUH, D. ; WADSWORTH, M.E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564-567, 1989.

24. BARKER, D.J. ; GODFREY, K.M. ; OSMOND, C. ; BULL, A. The relation of fetal length, ponderal index and head circumference to blood pressure and the risk of hypertension in adult life. **Paediatr Perinat Epidemiol**. V.6, n.1, p.35-44, 1992.

25. BARKER, D.J. ; OSMOND, C. ; SIMMONS, S.J.; WIELD, G.A. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. **BMJ**. V.13, n.306 (6875), p.422-6, 1993.

26. BARKER, D.J. The intra-uterine origins of disturbed cholesterol homeostasis. **Acta Paediatr**. V.88, n.5, p.483-4, 1999.

27. BARKER, D. J. The malnourished baby and infant. **Br Med Bull**, v. 60, p. 69-88, 2001.

28. BAR-PELED, O.; GROSS-ISSEROFF, R.; BEN-HUR, H., HOSKINS, I., GRONER, Y., BIEGON, A. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT1A receptors. **Neurosci Lett**. V.27, n.2, p. 173-6, 1991.

29. BARRETO-MEDEIROS, J. M. CABRAL FILHO, J.E. ; DE SOUZA, S.L. ; FREITAS SILVA, S.R. ; MENDES DA SILVA, C. ; DEIRO, T.C. ; MONTEIRO, J.M. ; GUEDES, R.C. ; DE CASTRO, C.M. ; MANHÃES DE CASTRO, R. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutr Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 211-214, 2002.

30. BARRETT, T.E. Clinical application of behavioral social skills training with children. **Psychol Rep**. v.57, n.3 Pt 2, p.1183-6, 1985

31. BARROS, K. M. ; MANHÃES-DE-CASTRO, R. ; LOPES-DE-SOUZA, S. MATOS, R.J., DEIRO, T.C. ; CABRAL-FILHO, J.E. ; CANON, F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci**, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, 2006.
32. BARROS, K. M. F. T.; CANON, F.; FREITAS-SILVA ; MANHAES-DE-CASTRO, R. ; GOUBEL, F. . Neonatal malnutrition: effects on contractile and elastic properties om rat soleus muscle. In: Congrès de la Société de Biomécanique, 2004, Creteil-França. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 2004. v. 112. p. 154-154.
33. BATISTA FILHO M., RISSIN A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cad Saude Publica**. V.19 Suppl 1:S181-91, 2003.
34. BAYOL, S. JONES, D. ; GOLDSPINK, G. ; STICKLAND, N.C. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br J Nutr**, v. 91, n. 3, p. 331-339, 2004.
35. BEDI, K. S.; BIRZGALIS, A.R. ; MAHON, M. ; SMART, J.L. ; WAREHAM, A.C. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refeed adult animals. **Br J Nutr**, v. 47, n. 3, p. 417-431, 1982.
36. BEDI, K.S. Nutritional effects on neuron numbers. **Nutr Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 141-152, 2003.
37. BELLINGER, L.; SCULLEY, D.V.; LANGLEY-EVANS, S.C. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. **Int J Obes (Lond)** v.30, n.5, p.729-38, 2006.
38. BÉNÉFICE, E.; FOUÉRE, T.; MALINA, R. M. Early nutritional history and motor performance of Senegalese children, 4-6 years of age. **Ann Hum Biol**, v. 26, n. 5, p. 443-455, 1999.
39. BENÍTEZ-BRIBIESCA, L., DEL LA ROSA –ALVAREZ, I., MANSILLA-OLIVARES, A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. **Pediatrics**. v.04, n.2, p.e21, 1999.
40. BENNIS-TALEB, N. ; REMACLE, C ; HOET, J.J. ; REUSENS, B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. **J Nutr**, v. 129, n. 8, p. 1613-1619, 1999.

41. BERCHTOLD MW, BRINKMEIER H, MÜNTENER M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev.** v.80, n.3, p.1215-65, 2000.
42. BERNEY, D. M.; DESAI, M. ; PALMER, D.J. ; GREENWALD, S. ; BROWN, A. ; HALES, C.N. ; BERRY, C.L. The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. **J Pathol**, v. 183, n.1, p. 109-115, 1997.
43. BHATIA, J. RASSIN, D.K. ; CERRETO, M.C. ; BEE, D.E. Effect of protein/energy ratio on growth and behavior of premature infants: preliminary findings. **J Pediatr**, v. 119, n. 1, p. 103-110, 1991.
44. BHATIA, V. P.; KATIYAR, G. P.; AGARWAL, K. N. Effect of intrauterine nutritional deprivation on neuromotor behaviour of the newborn. **Acta Paediatr Scand**, v. 68, n. 4, p. 561-566, 1979.
45. BILLETER, R., HEITZMAN, C.H., HOWALD, H. Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. **Eur J Biochem**; 116. 1981.
46. BISSONETTE, D. J.; MADAPALLIMATAM, A.; JEEJEEBHOY, K. N. Effect of hypoenergetic feeding and high-carbohydrate refeeding on muscle tetanic tension, relaxation rate, and fatigue in slow- and fast-twitch muscles in rats. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 2, p. 293-303, 1997.
47. BLY, L. What is the role of sensation in motor learning? **NDTA Network**, p.3-8, 1996.
48. BOGIN, B. Evolutionary perspective on human growth. **Annu Rev Anthropol**, v. 28, p. 109-153, 1999.
49. BONATTO, F.; POLYDORO, M.; ANDRADES, M.E.; CONTE DA FROTA, M.L.JR.; DAL-PIZZOL, F.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O. PERRY, M.L.; FONSECA MOREIRA, J.C.Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. **Neurosci Lett.** V.9, n.406(3), p.281-4, 2006.
50. BORBA, J. M. et al. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Res Bull**, v. 53, n. 2, p. 193-201, 2000.

51. BOSCO C, TARKKA I, KOMI PV. Effect of elastic energy and myoelectrical potentiation of triceps surae during stretch-shortening cycle exercise. **Int J Sports Med**. V.3, n.3, p.137-40, 1982.
52. BOTTINELLI, R., SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. **J Physiol**. v.437, p.655–72, 1991.
53. BOTTINELLI, R.; BETTO, R. ; SCHIAFFINO, S. ; REGGIANI, C. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology**, v. 478, p. 341-349, 1994.
54. BOTTINELLI, R.; CANEPARI, M. ; PELLEGRINO, M.A. ; REGGIANI, C. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. **J Physiol**, v. 495, n. 2, p. 573-586, 1996.
55. BRAUN S., CROIZAT B., LAGRANGE M-C, WARTER J-M, POINDRON P. Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. **Lancet**. 1995, v.345, p. 694-695.
56. BRIL, B. Une approche écologique de l'acquisition de la marche chez le jeune enfant. **Evolutions Psychomotrices**, v. 9, n. 38, p. 171-181, 1997.
57. BROCARD, F.; VINAY, L.; CLARAC, F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 117, n. 1, p. 81-89, 1999.
58. BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**. v.23, p.369 –79, 1970.
59. BROZANSKI, B. J.; WATCHKO, J.F. ; O'DAY, T.L. ; GUTHRIE, R.D. Effect of undernutrition on contractile and fatigue properties of rat diaphragm during development. **J Appl Physiol**. V.74, n.5, p.2121-6, 1993.
60. BURKE, R.E., LEVINE, D.N., TSAIRIS, P., ZAJAC, F.E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. **J. Physiol**, v.234, p. 723-748, 1973.

61. BURNS, Y. R.; MACDONALD, J. Desenvolvimento da motricidade desde o nascimento até os 2 anos de idade. In: Fisioterapia e crescimento na infância. São Paulo: Santos, p. 31-42, 1999.
62. BÜSCHER, D., IZPISÚA BELMONTE, J.C. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. **Cell Tissue Res.**v. 296, n.1, p.131-9, 1999.
63. BUTLER-BROWNE, G.S.; BUGAISKY, L.B. ; CUENOUD, S. ; SCHWARTZ, K. ; WHALEN, R.G. Denervation of newborn rat muscle does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. **Nature**, v. 299, n. 5886, p. 830-833, 1982.
64. BYRNE, K.A.; WANG, Y.H.; LEHNERT, S.A.; HARPER, G.S.; MCWILLIAM, S.M.; BRUCE, H.L.; REVERTER, A. Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction.**J Anim Sci.** v.83, n.1, p.1-12, 2005.
65. CAIOZZO, V.J.,HADDAD, F.,BAKER, M.J.,BALDWIN, K.M. Influence of mechanical loading on myosin heavy-chain protein and mRNA isoform expression. **J Appl Physiol.** V.80, n.5, p.1503-12, 1996.
66. CANON, F. GOUBEL, F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. **Pflugers Arch**, v. 429, n. 332-337, 1995.
67. CANON, F.; GOUBEL, F.; GUEZENNEC, C. Y. Effects of chronic low frequency stimulation on contractile and elastic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 118-124, 1998.
68. CAPUTE, A.J.; SHAPIRO, B.K. ; ACCARDO, P.J. ; WACHTEL, R.C. ; ROSS, A. ; PALMER, F.B. Motor functions: associated primitive reflex profiles.**Dev Med Child Neurol.** V.24, n.5, p.662-9, 1982.
69. CARLSON, B.M. Embriologia humana e biologia do desenvolvimento. 3ed. Mosby, Elsevier. 2005.
70. CARVER, J. D. et al. Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. **J Nutr**, v. 128, n. 4, p. 740-743, 1998.
71. CASTELLANO, C.; OLIVERIO, A. Early malnutrition and postnatal changes in brain and behavior in the mouse. **Brain Res**, v. 101, n. 2, p. 317-325, 1976.

72. CASTRO, C.A., RUDY, J.W. Early-life malnutrition selectively retards the development of distal- but not proximal-cue navigation. **Dev Psychobiol** v.20, p.521-37, 1987
73. CASTRO, C.A.; RUDY, J.W. Impaired short-term memory resulting from postnatal undernutrition is attenuated by physostigmine. **Behav Neural Biol** v.60, p.282-5, 1993.
74. CAVAGNA, G. A. Storage and utilization of elastic energy in skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 5, p. 89-129, 1977.
75. CELEDON, J. M.; DE ANDRADA, I. Psychomotor development during treatment of severely marasmic infants, **Early Hum Dev**, v. 3, n. 3, p. 267-275, 1979.
76. CELEDON, J. M.; COLOMBO, M. Effects of chlordiazepoxide on maze performance of rats subjected to undernutrition in early life. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 63, n. 1, p. 29-32, 1979.
77. CHANG, E. H.; KOTAK, V. C.; SANES, D. H. Long-term depression of synaptic inhibition is expressed postsynaptically in the developing auditory system. **J Neurophysiol**, v. 90, n. 3, p. 1479-1488, 2003.
78. CHAVES, N. **Nutrição Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
79. CHIAKULAS, J. J.; PAULY, J. E. A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. **Anat Rec**, v. 152, p. 55-61, 1965.
80. CINTRA, L.; GRANADOS, L. ; AGUILAR, A. ; KEMPER, T. ; DEBASSIO, W. ; GALLER, J. ; MORGANE, P. ; DURAN, P. ; DIAZ-CINTRA, S. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. **Hippocampus**. V.7, n.2, p.184-91, 1997.
81. CLARAC, F.; VINAY, L. ; CAZALETS, J.R., FADY, J.C. ; JAMON, M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. **Brain Res Brain Res**, v. 28, n. 1-2, p. 35-43, 1998.
82. CLARAC, F.; BROCARD, F. ; VINAY, L. The maturation of locomotor networks. **Prog Brain Res.**, v. 143 p. 57-66, 2004.

83. CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v. 52, n. 1, p. 129-197, 1972.
84. CONDON, K., SILBERSTEIN, L., BLAU H.M., THOMPSON, W.J. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. **Dev. Biol.** V.138, n.2, p.256-74, 1990.
85. CONSTANCIA, M. ; HEMBERGER, M. ; HUGHES, J. ; DEAN, W. ; FERGUSON-SMITH, A. ; FUNDELE, R. ; STEWART, F. ; KELSEY, G. ; FOWDEN, A. SIBLEY, C. ; REIK, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945-948, 2002.
86. CORDERO, M.E.; TREJO, M.; GARCIA, E.; BARROS, T.; COLOMBO, M. Dendritic development in the neocortex of adult rats subjected to postnatal malnutrition. **Early Hum Dev** v.12, p.309–21, 1985.
87. CORDOBA, N.E.; AROLFO, M.P.; BRIONI, J.D.; ORSINGHER, O.A. Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam** v.44, p.70–6, 1994.
88. CORNELISON, D.D., WOLD, B.J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. **Dev Biol.** 1997.
89. CRNIC, L.S. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. **Dev Psychobiol.** V.13, n.6, p.615-28, 1980.
90. DAVAL, G.; VERGE, D.; BASBAUM, A.I.; HAMON, M. Autoradiographic evidence of serotonin₁ binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neurosci Lett.** V.83, n1-2, p. 71-6, 1987.
91. DEBASSIO WA, KEMPER TL, TONKISS J, GALLER JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. **Brain Res Bull** v.41, p.379–83, 1996.
92. DEIRÓ, T.C. ; MANHÃES-DE-CASTRO, R. ; CABRAL-FILHO, J.E. ; BARRETO-MEDEIROS, J.M. ; SOUZA, S.L. ; MARINHO, S.M. ; CASTRO, F.M. ; TOSCANO, A.E. ; JESUS-DEIRO, R.A. ; BARROS, K.M. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiology & Behavior**. v. 87, p. 338-344, 2006.

93. DESAI, M.; GAYLE, D. ; BABU, J. ; ROSS, M.G. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. **Am J Obstet Gynecol.** V.193, n.3, Pt 2, p.1224-32, 2005.

94. DA-SILVA, A.T. COSTA, F.B. ; COSTA, J.A. ; TEODOSIO, N.R. ; CABRAL-FILHO, J.E. ; GUEDES, R.C. Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the northeast of Brazil. **Braz J Med Biol Res.** V.20, n.3-4, p.383-92, 1987.

95. DESAI, M.; BABU, J.; ROSS, M.G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol** v.293; n.6, R2306-14, 2007.

96. DE SOUZA, K.B.; FEOLI, A.M.; KRÜGER, A.H.; DE SOUZA, M.R.; PERRY, C.T.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. **Ann Nutr Metab.** v.48, n.4, p.246-50, 2004.

97. DE VRIES, J.L., VISSER, G.H., PRECHTL, H.F. The emergence of fetal behaviour. I. Qualitative aspects. **Early Hum Dev.** V.7, n.4, p.301-22, 1982.

98. DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L. ; ORTEGA, A. ; KEMPER, T. ; MORGANE, P.J. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. **J Comp Neurol.** v.292, n.1, p.117-26, 1990.

99. DIFEE, G.M. ; CAIOZZO, V.J. ; HERRICK, R.E. ; BALDWIN, K.M. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. **Am J Physiol.** V.260, n.3, Pt 1, p.C528-34, 1991.

100. DI MASO, N.A.; CAIOZZO, V.J.; BALDWIN, K.M. Single-fibre myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v.278, p.R1099–106, 2000.

101. DOBBING, J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 159, p.503-509, 1964.
102. DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. **Am J Dis Child**, v. 120, n. 5, p. 411-415, 1970.
103. DREWETT, R.; WOLKE, D.; ASEFA, M.; KABA, M.; TESSEMA, F. Malnutrition and mental development: is there a sensitive period? A nested case-control study. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 42, n. 2, p. 181-187, 2001.
104. DUCOMPS, C.; MAURIEGE, P.; DARCHE, B.; COMBES, S.; LEBAS, F.; DOUTRELOUX, J. P. Effects of jump training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen. **Acta Physiol Scand** v.178, n.3, p. 215-24, 2003.
105. DURÁN, P.; CINTRA, L.; GALLER, J.R.; TONKISS, J. Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats. **Nutr Neurosci**. V.8, n.3, p.167-72, 2005.
106. DWYER, C. M. ; MADGWICK, A.J. ; WARD, S.S. ; STICKLAND, N.C. Effect of maternal undernutrition in early gestation on the development of fetal myofibres in the guinea-pig. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, n. 5, p. 1285-1292, 1995.
107. EIKMANN S. H.; LIRA P. I. C.; LIMA M. C. Desenvolvimento mental e motor aos vinte e quatro meses de crianças nascidas a termo com baixo peso. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 3-B, p. 748-54, 2002.
108. EMERIT, M.B.; RIAD, M.; HAMON, M. Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. **Biol Neonate**. V.62, n.4, p. 193-201, 1992.
109. EKEN, T.; GUNDERSEN, K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles. **J Physiol**, v. 402, n. 651-669, 1988.
110. FAO. (Nutrition Country Profile –Brazil. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome, Italy: UN Press), p.36, 2000.

111. FENN, W.O.;MARSCH, B.S. Muscular force at different speeds of shortening. **J Physiol.** v.85, n.3, p.277-97, 1935.
112. FIOROTTO, M. L.; DAVIS, T.A., REEDS, P. J. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 4, p. R845-854, 2000.
113. FORSDAHL, A.; WAALER, H. T. [Height and weight of Norwegians during the late 1960's]. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v. 96,n. 4, p. 215-219, 1976.
114. FORSDAHL, A. Living conditions in childhood and subsequent development of risk factors for arteriosclerotic heart disease. The cardiovascular survey in Finnmark 1974-75. **J Epidemiol Community Health.** V.32, n.1, p.34-7, 1978.
115. FOX, M. W. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Animal Behavioral**, v. 13, p. 234-241, 1965.
116. FUCHTABUER, E. M.; WESTPHAL, H. MyoD and Myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Developmental Dynamics**, v. 193, p. 34-39, 1992.
117. GAROFANO, A.,CZERNICHOW, P.,BRÉANT, B. Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat. **Biol Neonate.** V.73, n.2, p.89-98, 1998.
118. GEISLER, H. C.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of posture in the rat. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 53, n. 4, p. 517-523, 1993.
119. GOJO, K.; ABE, S.; IDE, Y. Characteristics of myofibres in the masseter muscle of mice during postnatal growth period. **Anat Histol Embryol**, v. 31, n. 2, p. 105-112, 2002.
120. GOLDBERG, C.; SANT, A.V. Desenvolvimento motor normal. In: Tecklin JS. Fisioterapia pediátrica. São Paulo: Artmed, p. 13-34, 2002.
121. GOODLETT, C.R.; VALENTINO, M.L. ; MORGANE, P.J. ; RESNICK, O. Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. **Dev Psychobiol.**v.19, n.1, p.1-15, 1986.

122. GOPINATH, G.; BIJLANI, V.; DEO, M.G. Undernutrition and the developing cerebellar cortex in the rat. **J Neuropathol Exp Neurol.** v.35, n.2, p.125-35, 1976.
123. GOSSELIN, L. E.; ADAMS, C.; COTTER, T. A.; MCCORMICK, R. J.; THOMAS, D. P. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. **J Appl Physiol.** v.85, n.3, p.1011-6, 1998.
124. GOUBEL, F.; LENSEL-CORBEIL, G. Biomécanique-éléments de mécanique musculaire. **Masson**, p. 158, 2003.
125. GOUBEL, F.; MARINI, J.F. Fibre type transition and stiffness modification of soleus muscle of trained rats. **Pflugers Arch**, v. 410, n. 3, p. 321-325, 1987.
126. GRAMBKE, B.; LYONS, G.E.; HASELGROVE, J.; KELLY, A.M.; RUBINSTEIN, N.A. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. **FEBS Lett.** V.156, p. 335-339, 1983.
127. GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 4, p. 547-553, 1998.
128. GRAMSBERGEN, A.; WESTERGA, J. Locomotor development in undernourished rats. **Behav Brain Res.** v.48, n.1, p.57-64, 1992.
129. GRANTHAM-MCGREGOR, S.; SCHOFIELD, W.; POWER, C. Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-year follow-up. **Pediatrics.** V.79, n.2, p.247-54, 1987.
130. GREGOREVIC, P.; PLANT, D.R.; LEEDING, K.S.; BACH, L.A.; LYNCH, G.S. Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. **Am J Pathol.** V.161, n.6, p.2263-72, 2002.
131. GRIMBLE, R.F.; MANSARAY, Y.K. Effects in rats of dietary protein inadequacy on lactose production, milk volume and components of the lactose synthetase complex (EC 2.4.1.22). **Ann Nutr Metab.** V.31, n.3, p.179-84, 1987.
132. HALL, R.D. The role of body size in climbing and locomotor behavior of protein-malnourished and well-nourished rats. **Dev Psychobiol.** v.17, n.1, p.91-106, 1984.

133. HALES, C.N; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.
134. HALES, C. N. ; BARKER, D.J. ; CLARK, P.M. ; COX, L.J. ; FALL, C. ; OSMOND, C. ; WINTER, P.D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, v. 303, n. 6809, p. 1019-1022, 1991.
135. HALTIA, M.; HALTIA, M. ; BERLIN, O. ; SCHUCHT, H. ; SOURANDER, P. Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibres in normal and undernourished rats. A histochemical and morphometric study. **J Neurol Sci**, v. 36, n.1, p. 25-39, 1978.
136. HARDING JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. **Int J Epidemiol** 30:15–23. 2001.
137. HARRISON, A.P.; ROWLERSON, A.M.; DAUNCEY, M.J. Selective regulation of myofiber differentiation by energy status during postnatal development. **Am J Physiol**. v.270, n.3, Pt 2, p.R667-74, 1996.
138. HATTERSLEY, A. T.; CLARK, P.M. ; PAGE, R. ; LEVY, J.C. ; COX, L. ; HALES, C.N. ; TURNER, R.C. Glucokinase deficiency results in a beta-cell disorder characterised by normal fasting plasma proinsulin concentrations. **Diabetologia**, v. 40, p. 1367-1368, 1997.
139. HATTERSLEY, A. T.; BEARDS, F. ; BALLANTYNE, E. ; APPLETON, M. ; HARVEY, R. ; ELLARD, S. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. **Nat Genet**, v. 19, p. 268-270, 1998.
140. HAUGEN, P.; STEN-KUNDSSEN, O. The dependence of the short-range elasticity on sarcomere length in resting isolated frog muscle fibres. **Acta Physiol Scand**, v. 112, n. 2, p. 113-120, 1981.
141. HAWKER, T.J., GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**.v.91, n.2, p.534-51, 2001. Review. Erratum in: **J Appl Physiol** v.91, n.6, p.2414, 2001.

142. HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D.E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* v.50, p.817–23, 2001.
143. HERNANDES, A. S.; ALMEIDA, S. S. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. *Nutr Neurosci.* v.6, n.4, p.213-9, 2003.
144. HERTZ, R.H.; TIMOR-TRITSCH, I., DIERKER, L.J.; CHIK, L.; ROSEN, M.G. Continuous ultrasound and fetal movement. *Am J Obstet Gynecol.* V.135, n.1, p.152-4, 1979.
145. HEYWOOD, W.E.; MIAN, N.; MILLA, P.J.; LINDLEY, K.J. Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci (Lond).* V.107, n.1, p.37-45, 2004.
146. HILL, A. V. The physical analysis of events in muscular contraction. *Rev Can Biol*, v. 10, n. 2, p. 103-118, 1951.
147. HILL, A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. Roy. Soc. B.*, v.126, p.136-195, 1938.
148. HOLEMANS ,K.;AERTS, L.;VAN ASSCHE, F.A. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig*, v.10,n.7, p.392-9, 2003 Review
149. HOLSON, R. R.; WALKER, C. Mesial prefrontal cortical lesions and timidity in rats. II. Reactivity to novel stimuli. *Physiol Behav*, v. 37, n. 2, p. 231-238, 1986.
150. HOPPE, C.C., EVANS, R.G., BERTRAM, J.F., MORITZ, K.M. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v.292, n.5, p.R1768-74, 2007.
151. HOROWITS, R. Passive force generation and titin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Biophys J.* v.61, n.2, p.392-8, 1992.
152. HOWELLS, K. F.; MATHEWS,D.R.; JORDAN, T. C. Effects of pre and perinatal malnutrition on muscle fibres from fast and slow rat muscles. *Res Exp Med (Berl)*, v.173, n.1, p.35-40, 1978.

153. HUXLEY, A.F.; SIMMONS, R.M. Proposed mechanism of force generation in striated muscle **Nature (London)** v. 233, p. 533–538, 1971.

154. ISHIARA, A.; TAGUCHI, S. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. **Jpn J Physiol**, v. 41, n. 2, p. 251-258, 1991.

155. IVANOVIC, D. M. ; LEIVA, B.P. ; PEREZ, H.T. ; INZUNZA, N.B. ; ALMAGIA, A.F. ; TORO, T.D. ; URRUTIA, M.S. ; CERVILLA, J.O. ; BOSCH, E.O. Long-term effects of severe undernutrition during the first year of life on brain development and learning in Chilean high-school graduates. **Nutrition**, v. 16, n. 11-12, p. 1056-1063, 2000.

156. IVANOVIC, D.; CASTRO, C.G.; IVANOVIC, R. Food and nutrition knowledge of elementary and high school-age children from Chile's Metropolitan Region. **Rev Med Chil**, v. 124, n. 9, p. 1058-1070, 1996.

157. IVANOVIC, D.; OLIVARES, M.; CASTRO, C.; IVANOVIC, R. Head circumference in Chilean school children 5 to 18 years of age and socioeconomic status. **Rev Med Chil**.v.123, n.5, p.587-99, 1995.

158. JAGOE, R.T.; LECKER, S.H.; GOMES, M.; GOLDBERG. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. **FASEB J**. v.16, n.13, p.1697-712, 2002.

159. JAISWAL, A.K. ; UPADHYAY, S.N. ; SATYAN, K.S. ; BHATTACHARYA, S.K. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. **Indian J Exp Biol**.v.34, n.12, p.1216-9, 1996.

160. JEAGER, C.B.; JOH, T.H. Transient expression of tyrosine hydroxylase in some neurons of the developing inferior colliculus of the rat. **Brain Res**. v.313, n.1, 128-32, 1983.

161. KADI, F.; THORNELL, L.E. Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. **Histochem Cell Biol**, v. 113, n. 2, p. 99-103, 2000.

162. KARUNARATNE, J.F.; ASHTON, C.J.; STICKLAND, N.C. Fetal programming of fat and collagen in porcine skeletal muscles. **J Anat**. v.207, n.6, p.763-8, 2005.

163. KEHOE, P.; MALLINSON, K. ; BRONZINO, J. ; MCCORMICK, C.M. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 132, n. 1, p. 23-31, 2001.
164. KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N. A. Why are fetal muscles slow? **Nature**. V.20, n.288(5788), p.266-9, 1980.
165. KHANNA, V.K., HUSAIN, R.; SETH P.K. Effect of protein malnutrition on the neurobehavioural toxicity of styrene in young rats. **J Appl Toxicol**. V.14, n.5, p.351-6, 1994.
166. KISS, B.; KARSAI, A., KELLERMAYER, M.S. Nanomechanical properties of desmin intermediate filaments. **J.Struct Biol.**, v.155, n.2, p. 327-39, 2006.
167. KNAPCZYK, M. The motor development of the human being. **Ortop Traumatol Rehabil**. v.3, n.4, p.456-61, 2001.
168. KOISHI, K.; ZHANG, M. ; MCLENNAN, I.S. ; HARRIS, A.J. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. **Developmental Dynamics**, v. 202, p. 244-254, 1994.
169. KOVANEN, V. Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. An experimental study on the properties of collagen, laminin, and fibre types in muscles serving different functions. **Acta Physiol Scand** v.577, p.1-56, 1989.
170. KOVANEN, V.; SUOMINEN, H.; HEIKKINEN, E. Collagen of slow twitch and fast twitch muscle fibres in different types of rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 52, n. 2, p. 235-242, 1984.
171. KOVANEN, V.; SUOMINEN, H.; HEIKKINEN, E. Connective tissue of "fast" and "slow" skeletal muscle in rats--effects of endurance training. **Acta Physiol Scand**, v. 108, n. 2, p. 173- 180, 1980.
172. KWONG, W.Y.,WILD, A.E., ROBERTS, P.,WILLIS, A.C., FLEMING, T.P. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. **Development** v.127, n.19, p.4195-202, 2000.
173. LAUDER, J.M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. **Tends Neurosci**. V.16, n.6, p. 233-40, 1993.

174. LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. **Nature**. V.283, p. 249-256, 1980.
175. LEE, E.H.; GAO, M.; PINOTSIS, N.; WILMANNS, M.; SCHULTEN, K. Mechanical strength of the titin Z1Z2-telethonin complex. **Structure**. v.14, n.3, p.497-509, 2006.
176. LEFAUCHEUR, L.; ECOLAN, P. ; BARZIC, Y.M. ; MARION, J. ; LE DIVIDICH, J. Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 140-147, 2003.
177. LENSEL-CORBEIL, G.; GOUBEL, F. Series elasticity in frog sartorius muscle during release and stretch. **Arch Int Physiol Biochim**. V.97, n.6, p.499-509, 1989.
178. LESAGE, J.; HAHN, D. ; LEONHARDT, M. ; BLONDEAU, B. ; BREANT, B. ; DUPOUY, J.P. Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. **J Endocrinol**, v. 174, n. 1, p. 37- 43, 2002.
179. LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total numbers of cells. **Exp Brain Res**, v. 37, n. 2, p. 283- 298, 1979.
180. LEVIN A., WYMAN, J. The viscous elastic properties of muscle. **Proc. Roy. Soc. B**. 101, 218-243. 1927.
181. LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. **Nature**, v. 225, n. 5231, p. 468-469, 1970.
182. LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. **Science**, v. 176, n. 30, p. 68-71, 1972.
183. LIDOV, H.G.; MOLLIVER, M.E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. **Brain Res Bull**, v. 8, n. 4, p. 389-430, 1982.
184. LISBOA, P.C.; FAGUNDES, A.T.; DENOLATO, A.T.; OLIVEIRA, E.; BONOMO, I.T.; ALVES, S.B.; CURTY, F.H.; PASSOS, M.C.; MOURA, E.G. Neonatal low-

protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. **Exp Biol Med (Maywood)**. V.233, n.1, p.57-63, 2008.

185. LUCAS, A. Programming in early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-53, 1991.

186. LUCAS, A.; FEWTRELL, M. S.; COLE, T. J. Fetal origins of adult disease the hypothesis revisited. **BMJ**, v. 319, n. 7204, p. 245-249, 1999.

187. LUKOYANOV, N. V. ; ANDRADE, J.P. ; DULCE MADEIRA, M. PAULA-BARBOSA, M.M. Effects of age and sex on the water maze performance and hippocampal cholinergic fibers in rats. **Neurosci Lett**, v. 269, n. 3, p. 141-144, 1999.

188. LYNCH, A, SMART, J.L., DOBBING, J. Motor co-ordination and cerebellar size in adult rats undernourished in early life. **Brain Res**, v. 83, n. 2, p. 249-259, 1975.

189. MCCRABB, G.J.,EGAN, A.R.,HOSKING, B.J. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy.**Br J Nutr**. V.65, n.2, p.157-68, 1991.

190. McCOMAS, A.J. Skeletal muscle: form and function. Champaign: Human Kinetics, 1996.

191. MALINA, R.M.;HABICHT, J.P.; MARTORELL, R.; LECHTIG, A.,YARBROUGH, C.; KLEIN, R.E. Head and chest circumferences in rural Guatemalan Ladino children, birth to seven years of age.**Am J Clin Nutr**. V.28, n.9, p.1061-70, 1975.

192. MANDICH, M.; SIMONS, C.J.; RITCHIE, S.; SCHMIDT, D.; MULLETT, M. Motor development, infantile reactions and postural responses of preterm, at-risk infants. **Dev Med Child Neurol**. v.36, n.5, p.397-405, 1994.

193. MANHÃES DE CASTRO, R.; BARRETO MEDEIROS, J.M. ; MENDES DA SILVA, C. ; FERREIRA, L.M. ; GUEDES, R.C. ; CABRAL FILHO, J.E. ; COSTA JA. Reduction of intra specific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Brazilian J. Med. biol. Res.**, v. 34, n.1, p.121-

4, 2001.

194. MARÍN, M.C. ; DE TOMAS, M.E. ; SERRES, C. ; MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **J Nutr**, v. 125, n. 4, p.1017-1024, 1995.
195. MALTIN, C.A., DELDAY, M.I., SINCLAIR, K.D., STEVEN, J., SNEDDON, A.A. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v.122, n.3, p.359-74, 2001.
196. MASSARO, T. F.; LEVITSKY, D.A.; BARNES, R. H. Protein malnutrition in the rat: its effects on maternal behavior and pup development. **Dev Psychobiol**, v. 7, n. 6, p. 551-561, 1974.
197. MASSION, J. Postural control systems in developmental perspective. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 4, p. 465-472, 1998.
198. MILLER, J.P.E.; GERMAN, R.Z. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 2061-2069, 1999.
199. MCCRABB, G. J.; EGAN, A. R.; HOSKING, B. J. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy. **Br J Nutr**, v. 65, n. 2, p. 157-168, 1991.
200. MCDONALD, T. F.; PELZER, S., TRAUTWEIN, W. ; PELZER, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 365-507, 1994.
201. MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, V.24, p.1161-92, 2001.
202. MELLOR, D. J.; MURRAY, L. Effects on the rate of increase in fetal girth of refeeding ewes after short periods of severe undernutrition during late pregnancy. **Res Vet Sci**, v. 32, n. 3, p. 377-382, 1982.

203. MOREIRA, GMS, DE ARAÚJO M, DE OLIVEIRA LM, ALMEIDA SS. The behavior of protein-calorie-malnourished rats on the elevated plus-maze test: an ethopharmacological analysis. **Psychobiology** v.25, p.180–5, 1997.
204. MORGANE, P. J. ; MILLER, M. ; KEMPER, T. ; STERN, W. ; FORBES, W. ; HALL, R. ; BRONZINO, J. ; KISSANE, E. ; HAWRYLEWICZ, E. ; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 230-137, 1978.
205. MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.17, p.91-128, 1993.
206. MORGANE, P. J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n .4, p. 471-483, 2002.
207. MOURA, E.G.;PASSOS, M.C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism.**Biosci Rep**. v.25, n.3-4, p.251-69, 2005.
208. MUTUNGI, G.; RATANUNGA, K. W. The viscous, viscoelastic and elastic characteristics of resting fast and slow mammalian (rat) muscle fibres. **J Physiol**, v. 496, n. 3, p. 827-836, 1996.
209. MUTUNGI, G.; TRINICK, J.; RANATUNGA, K.W. Resting tension characteristics in differentiating intact rat fast- and slow-twitch muscle fibers. **J Appl Physiol**. v.95, n.6, p.2241-7, 2003.
210. NAGY, Z. M.; PORADA, K. J.; ANDERSON, J. A. Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. **J Comp physiol Psychol**, v. 91, n. 3, p. 682, 696, 1977.
211. NISHI, R. Neurotrophic factors: two are better than one. **Science** v.265, p.1052-1053, 1994.

212. NOBACK, C. R.; EISENMAN, L. M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. **Anat Rec**, v. 201, n. 1, p. 67-73, 1981.

213. NYHOLM, B.; QU Z, KAAL, A.; PEDERSEN, S.B.; GRAVHOLT, C.H.; ANDERSEN, J.L. et al. Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM. **Diabetes** v.46, p.1822– 8, 1997.

214. OLHWEILER, L.; DA SILVA, A.R.; ROTTA, N.T. Primitive reflex in premature healthy newborns during the first year. **Arq Neuropsiquiatr**. v.63, n.2A, p.294-7, 2005.

215. ONTELL, M.; DUNN, R. F. Neonatal muscle growth: a quantitative study. **Am J Anat**, v. 152, n. 4, p. 539-555, 1978.

216. ONTELL, M.; KOZEKA, K. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. **Am J Anat**, v. 171, n. 2, p. 133-148, 1984.

217. OPPENHEIM, R.W. Cell death during development of the nervous system. **Annu Rev Neurosci**. v.14, p.453-501, 1991.

218. OZANNE SE, MARTENSZ ND, PETRY CJ, LOIZOU CL, HALES CN. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. **Diabetologia** v.41, p.1337– 42, 1998.

219. OZANNE SE, NICHOLAS HALES C. Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death. **Mech Ageing Dev** v.126, p.852– 4, 2005.

220. OZANNE, S. E, HALES, C. N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. **Proc Nutr Soc**, v. 58, n 3, p. 615-619, 1999.

221. OUMI, M.; MIYOSHI, M.; YAMAMOTO, T. The ultrastructure of skeletal and smooth muscle in experimental protein malnutrition in rats fed a low protein diet. **Arch Histol Cytol**, v. 63, n. 5, p. 451-457, 2000.

222. OZANNE, S. E. et al. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1, p. E559-564, 1996.
223. OZANNE, S. E. et al. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. **J Endocrinol**, v. 177, n. 2, p. 235-241, 2003.
224. PAINE, R.S. et al. Evolution of postural reflexes in normal infants and in the presence of chronic brain syndromes. **Neurology**, v. 14, p. 1036-1046, Nov, 1964.
225. PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v.20, n. 11, p. 1603-1612.
226. PASSOS, M.C.; DA FONTE RAMOS, C.; DUTRA, S.C.; MOUCO, T.; DE MOURA, E.G. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. **Horm Metab Res**. v.34, p.40 –3, 2002.
227. PARK, K. S. ; KIM, S.K. ; KIM, M.S. ; CHO, E.Y. ; LEE, J.H. ; LEE, K.U. ; PAK, Y.K. ; LEE, H.K. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J Nutr**, v. 133, n. 10, p. 3085-3090, 2003.
228. PATIN, V.; VINCENT, A. ; LORDI, B. ; CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? **Brain Res Dev Brain Res**. V.149, n.2, p.85-92, 2004.
229. PEREZ-TORRERO, E.; TORREROB, C. ; COLLADO, P. ; SALAS, M. A paradigm of undernourishing and neonatal rehabilitation in the newborn rat. **Nutr Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 113-115, 2003.
230. PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**. v.50, n.6, p.500-9, 2000.
231. PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. **Muscle Nerve**, v. 8, n. 8, p. 676-689, 1985.

232. PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; MELCHIOR, K.; ROHDE, W.; DÖRNER, G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **J Nutr.** V.130, n.10, p.2582-9, 2000.
233. POUSSON, M.; PÉROT, C.; GOUBEL, F. Stiffness changes and fibre type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training. **Pflugers Arch**, v. 419, n. 2, p. 127-130, 1991.
234. PRAKASH, Y. S.; FOURNIER, M.; SIECK, G. C. Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. **J Appl Physiol**, v. 75, n. 3, p. 1044-1052, 1993.
235. PRICE, M.G. Striated muscle endosarcomeric and exosarcomeric lattices. In: *Advances in structural biology*. Edited by JAI Press, Vol 1, p 175-207. 1991.
236. PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Do cross-bridges contribute to the tension during stretch of passive muscle? **J Muscle Res Cell Motil**, v. 20, n. 5-6, p. 433-442, 1999.
237. PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.** V.463, n.1-3, p.3-33, 2003.
238. PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. **Acta Histochem**, v. 106, n. 2, p. 145-154, 2004.
239. PURVES, D.; RIDDLE, D.R. ; WHITE, L.E. ; GUTIERREZ-OSPINA, G. Neural activity and the development of the somatic sensory system. **Curr Opin Neurobiol**, v. 4, n. 1, p. 120-123, 1994.
240. RANATUNGA, K.W. Temperature-dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle. **J Physiol.** v.329, p.465-83, 1982.
241. RAYNE, J.; CRAWFORD, G. N. Increase in fibre numbers of the rat pterygoid muscles during postnatal growth. **J Anat**, v. 119, n. 2, p. 347-357, 1975.
242. 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.** V.123, n.11, p.1939-51, 1993.

243. REISER, P. J.; MOSS, R.L. ; GIULIAN, G.G. ; GREASER, M.L. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. **J Biol Chem**, v. 260, n. 16, p. 9077-9080, 1985.

244. RESNICK, O. MILLER, M. ; FORBES, W. ; HALL, R. ; KEMPER, T. ; BRONZINO, J. ; MORGANE, P.J. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 3, n. 4, p. 233-246, 1979.

245. RICE, D; BARONE, J. R. S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 108, n. S3, 511-533, 2000.

246. RIUL, T. R.; CARVALHO, A.F. ; ALMEIDA, P.S. ; DE-OLIVEIRA, L.M. ; ALMEIDA, S.S. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 8, p. 975, 983, 1999.

247. ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Braz J Med Biol Res**. v.30, n.5, p.663-9, 1997.

248. RODRIGUEZ-PEREZ, M.C.; DE VICENTE-PEREZ, F.; GOMEZ-JARABO GARCIA, G. Effects of protein malnutrition and the administration of cortisol on the reflexologic development in rats. **Behav Neural Biol**. V.58, n.3, p.165-70, 1992.

249. ROSSO, P.; HORMAZÁBAL, J.; WINICK, M. Changes in brain weight, cholesterol, phospholipid and DNA content in marasmic children. **Am J Clin Nutr**, v. 23, n. 10, p. 1275-1279, 1970.

250. ROY BC, OSHIMA I, MIYACHI H, SHIBA N, NISHIMURA S, TABATA S, IWAMOTO H. Effects of nutritional level on muscle development, histochemical properties of myofibre and collagen architecture in the pectoralis muscle of male broilers. **Br Poult Sci**. v.47, n.4, p.433-42, 2006.

251. RUBINSTEIN, N.A.,KELLY, A.M. Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. **J Cell Biol**. 1981 Jul;90(1):128-44.

252. SALAS, M.; FRIAS, C. ; TORRERO, C. ; REGALADO, M. ; LORANCA, A. Swimming and self-grooming development in pups nursed by neonatally underfed rats. **Growth Dev Aging**, v. 62, p. 67–75, 1998.

253. SALVIATI G, BETTO R, CEOLDO S, PIEROBON-BORMIOLI S. Morphological and functional characterization of the endosarcomeric elastic filament. **Am J Physiol.** v.259, n.1, Pt 1, p.C144-9, 1990.
254. SAMPAIO DE FREITAS M, GARCIA DE SOUZA EP, VARGAS DA SILVA S, DA ROCHA KAEZER A, DA SILVA VIEIRA R, SANCHEZ MOURA A, BARJA-FIDALGO C. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. **Biochim Biophys Acta.** V.1639, n.1, p.8-16, 2003.
255. SANTOS, L.M., MARLÚCIA, O. ASSIS, A., BAQUEIRO, C.M., QUAGLIA, G.M., MORRIS, S.S., BARRETO, M.L. Nutritional and feeding status of preschool children in the semi-arid region of Bahia (Brazil): I. Anthropometric assessment. **Rev Saude Publica.** V.29, n.6, p.463-71, 1995.
256. SAYER AA; COOPER, C. ; EVANS, J.R. ; RAUF, A. ; WORMALD, R.P. ; OSMOND, C. ; BARKER, D.J. Are rates of ageing determined in utero? **Age Ageing.** V.27, n.5, p.579-83, 1998.
257. SEALE, P., RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev Biol.** V.218, n.2, p.115-24, 2000.
258. SEGURA, B.; GUADARRAMA, J.C. ; PRATZ, G. ; MERCADO, V. ; MERCHANT, H. ; CINTRA, L., JIMENEZ, I. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. **Neurosci Lett.** V.354, n.3, p.181-4, 2004.
259. SCHMID, M.; CONFORTO, S. ; LOPEZ, L. ; RENZI, P. ; D'ALESSIO, T. The development of postural strategies in children: a factorial design study. **J Neuroeng Rehabil,** p. 2-29, 2005.
260. SCHNEIDER K, ZERNICKE RF, ULRICH BD, JENSEN JL, THELEN E. Understanding movement control in infants through the analysis of limb inter-segmental dynamics. **Journal of Motor Behavioral,** v. 22, n. 4, p. 493-520, 1990.
261. SHORTEN, R. M. Muscle elasticity and human performance. In: *Medicine and Sport Science*, vol. 25, Ed. Karger, Basel, p. 1-18, 1987.
262. SHRADER, R.E.; FERLATTE, M.I.; HASTINGS-ROBERTS, M.H.; SCHOENBORNE, B.M.; HOERNICKE, C.A.; ZEMAN, F.J. Thyroid function in prenatally protein-deprived rats. **J Nutr.** v.107, p.221-9, 1977.

263. SILVA, H. J., MARINHO, S.M.O.C., SILVA, A.E.T.M. ALBUQUERQUE, C.G., MORAES, S.R.A., CASTRO, RM Protocolo de Medidas para Evaluación de Indicadores de Desarrollo Somático en Ratas Wistar. **Int. J. Morphol.** vol.23, no.3, p.227-230, 2005.

264. SILVA, H.J., BARROS, K.M.F.T., CUNHA, D.A. SANTOS, F.A.S. ; SOARES, E.B. ; DA SILVA, C.N.S. ; MORAES, S.R.A. ; CASTRO, R.M. Desnutrición y Evaluación del Desarrollo Somático: Uso del Protocolo de Medidas para la Evaluación de los Indicadores en Rats Wistar. **Int. J. Morphol.**, vol.24, no.3, p.469-474, 2006.

265. SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Res**, v. 33, n. 2, p. 303-314, 1971.

266. SMITH, F. M.; GARFIELD, A. S.; WARD, A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, p. 279-291, 2006.

267. SMITTH, L.K.; WEISS, E.L.; LEHMKUHL, L.D. Cinesiologia Clínica de Brunnstrom. 5ed. Monole Editora. 1997.

268. SNOECK, A.; REMACLE, .C; REUSENS, B.; HOET, J.J.Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas.**Biol Neonate**. V.57, n.2, p.107-18,1990.

269. SOBOTKA, T. J.; COOK, M. P.; BRODIE, R. E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. **Brain Res**, v. 65, n. 3, p. 443-457, 1974.

270. SPURR, G.B.; REINA, J.C.; DAHNERS, H.W.; BARAC-NIETO, M. Marginal malnutrition in school-aged Colombian boys: functional consequences in maximum exercise.**Am J Clin Nutr**. V.37, n.5, p.834-47, 1983.

271. STARON, R.S.; JOHNSON,P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. **Comp Biochem Physiol B**, v. 106, n. 3, 463-475, 1993.

272. STEVENSON, E.J.; KONCAREVIC, A.;GIRESI, P.G.; JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C.Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy.**J Appl Physiol**. v.98, n.4, p.1396-406, 2005.

273. TAKAKUSAKI, K. Forebrain control of locomotor behaviors. **Brain Res Rev**, v. 57 n. 1, p. 192-198, 2008.
274. TALMADGE, R.J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. **Muscle Nerve**. V.23, n.5, p.661-79, 2000.
275. TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 8, p. 881-886, 1992.
276. TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S. Absolute and relative growth of rat skeletal muscle. **Physiol Behav**. V.57, n.5, p.,913-9, 1995.
277. TAMAKI, T. AKATSUKA, A. ; YOSHIMURA, S. ; ROY, R.R. ; EDGERTON, V.R. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscles during postnatal growth. **The journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1097-1111, 2002.
278. TEODÓSIO, N. R. FILHO, J.E. ; GUEDES, R.C. ; COSTA, J.A. ; RAMOS COSTA, F.B. ; DA SILVA, A.T. Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. **Acta Physiol Lat Am**. V.29, n.4-5, p.255-62, 1979.
279. THAME, M.; WILKS, R.J.; MCFARLANE-ANDERSON, N.; BENNETT, F.I.; FORRESTER, T.E. Relationship between maternal nutritional status and infant's weight and body proportions at birth. **Eur J Clin Nutr**. V.51, n.3, p.134-8, 1997.
280. THELEN, E.; ULRICH, B.D.; NILES, D. Bilateral coordination in human infants: stepping on a split-belt treadmill. **J Exp Psychol Hum Percept Perform**. V.13, n.3, p.405-10, 1987.
281. TONKISS, J. SHULTZ PL, BONNIE KE, HUDSON JL, DURAN P, GALLER JR. Spatial learning deficits induced by muscimol and CL218,872: lack of effect of prenatal malnutrition. **Nutr Neurosci**, v. 6, n. 6, p. 379-387, 2003.
282. TOSCANO, A. E. BARROS, K.M. GOUBEL, F., MANHAES-DE-CASTRO R., CANON F. Mechanical properties in young and adult rat muscles submitted to neonatal undernutrition. **Journal of Biomechanics**, v. 39, Suppl. 1, p. S490, 2006.

283. TOSCANO, A. E, MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition** , v. 24 , n. 3, p. 270 - 278A ,2008a.
284. TOSCANO AE, AMORIM MA, DE CARVALHO FILHO EV, ARAGÃO RDA S, CABRAL-FILHO JE, DE MORAES SR, MANHAES-DE-CASTRO R. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sci.** v.82, n.21-22, p.1131-6, 2008b.
285. TOURSEL T, STEVENS L, GRANZIER H, MOUNIER Y. Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions. **J Appl Physiol.** v.92, n.4, p.1465-72, 2002.
286. TRINICK, J.; TSKHOVREBOVA, L. Titin: a molecular control freak. **Trends Cell Biol.** V.9, n.10, p.377-80, 1999.
287. UNICEF. The state of the world's children 2000. United Nations Children's Fund. Oxford University Press. New York. 2000.
288. UNGERER, J.A.; SIGMAN, M. Developmental lags in preterm infants from one to three years of age. **Child Dev.** V.54, n.5, p.1217-28, 1983.
289. VANDEWILLÉ, H. Ergométrie. In: Biologie de l'exercice musculaire. Ed. Masson, Paris, p. 123-156, 1992.
290. VESCOVO, G. AMBROSIO, G., DALLA LIBERA, L. Apoptosis and changes in contractile protein pattern in the skeletal muscle in heart failure. **Acta Physiol Scand.** V.171, n.3, p.305-10, 2001.
291. VICKERS, M. H. BREIER BH, MCCARTHY D, GLUCKMAN PD. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 1, p. R271-273, 2003.
292. VINAY, L. BEN-MABROUK F, BROCARD F, CLARAC F, JEAN-XAVIER C, PEARLSTEIN E, PFLIEGER JF. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. **Neural Plast**, v. 12, n. 2-3, p. 131-139, 2005.
293. WACHS, T. D. Relation of mild-to-moderate malnutrition to human development: correlational studies. **J Nutr**, v. 125, Suppl. 8, p. 2245S-2254S. 1995.

294. WALTON, K.D. LIEBERMAN D, LLINAS A, BEGIN M, LLINAS RR. Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. **Neuroscience**, v. 51, n. 4, p. 763-767, 1992.
295. WANG, K. MCCARTER R, WRIGHT J, BEVERLY J, RAMIREZ-MITCHELL R. Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7101-7105, 1991.
296. WANG, K. MCCARTER R, WRIGHT J, BEVERLY J, RAMIREZ-MITCHELL R. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. **Biophysical Journal**, v. 64, p. 1161-1177, 1993.
297. WANK V BAUER R, WALTER B, KLUGE H, FISCHER MS, BLICKHAN R, ZWIENER U. Accelerated contractile function and improved fatigue resistance of calf muscles in newborn piglets with IUGR. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.278, n.2, p.R304-10, 2000.
298. WAREHAM, A.C., MAHON, M., BEDI, K.S., SMART, J.L. Early life undernutrition in rats. 2. Some contractile properties of skeletal muscles from adult animals. **Br J Nutr**. V.47, n.3, p.433-7, 1982.
299. WARREN, DAVID. H. Blindness and early childhood development. New York: **American Foundation for the blind**, 1984.
300. WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **Am J. Clin. Nutr**. V.69, n.2, p.179-97, 1999.
301. WAUBEN, I.P.; WAINWRIGHT, P.E. The influence of neonatal nutrition on behavioral development: a critical appraisal. **Nutr Rev**. v.57, n.2, p.35-44, 1999.
302. WEAVER DD, CHRISTIAN JC. Familial variation of head size and adjustment for parental head circumference. **J Pediatr**. V.96, n.6, p.990-4, 1980.
303. WELLS, J. C. The programming effects of early growth. **Early Hum Dev**, v. 83, n. 12, p. 743-748, 2007.
304. WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. **Brain Res Dev Brain Res**. v.57, n.2, p.163-74, 1990.

305. WIGSTON, D. J.; ENGLISH, A. W. Fiber-type proportions in mammalian soleus muscle during postnatal development. **J Neurobiol**, v. 23, n. 1, p. 61-70, 1992.
306. WILSON, S. J.; ROSS, J. J.; HARRIS, A. J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development**, v. 102, p. 815-821, 1988.
307. WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J Nutr** (the journal of nutrition), v. 89, n. 3, p. 300-306, 1966.
308. WINICK; M.BRASEL, J. A.; ROSSO, P. Nutrition and cell growth. **Curr Concepts Nutr**, v. 1, p. 49-97, 1972.
309. WOITTIEZ, R. D. BRAND C, DE HAAN A, HOLLANDER AP, HUIJING PA, VAN DER TAK R, RIJNSBURGER WH. A multipurpose muscle ergometer. **J Biomech**, v. 20, n. 2, p. 215- 218, 1987.
310. WOODALL, S. M. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. **Pediatr Res**, v. 40, n. 3, p. 438-443, 1996.
311. YAJNIK C. Interactions of perturbations in intrauterine growth and growth during childhood on the risk of adult-onset disease. **Proc Nutr Soc** v.59, p.257– 65, 2000.
312. YASKI. O, EILAM, D. How do global and local geometries shape exploratory behavior in rats? **Behav Brain Res**. v.187, n.2, p.334-42, 2008.
313. YOUNG, L. E. Imprinting of genes and the Barker hypothesis. **Twin Res**, v. 4, p. 307-317, 2001.
314. ZAMBRANO, E. MARTINEZ-SAMAYOA PM, BAUTISTA CJ, DEAS M, GUILLEN L, RODRIGUEZ-GONZALEZ GL, GUZMAN C, LARREA F, NATHANIELSZ PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. **J Physiol**, v. 566, n. 1, p. 225-236, 2005.
315. ZERNICKE, R.F.; SCHNEIDER, K. Biomechanics and developmental neuromotor control.**Child Development**, v.64, p.982-1004, 1993.

316. ZHAN, X.A.; WANG, M.; REN, H.; ZHAO, R.Q.; LI, J.X.; TAN, Z.L. Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. **Poult Sci.** v.86, n.4, p.654-60, 2007.
317. ZHU, M.J.; FORD, S.P.; MEANS, W.J.; HESS, B.W.; NATHANIELSZ, P.W.; DU, M. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J Physiol.** v.575, pt 1, p.241–50, 2006.
318. ZUUBIER, C. J.; HUIJING, P. A. Influence of muscle geometry on shortening speed of fibre, aponeurosis and muscle. **J Biomech**, v. 25, n. 9, p. 1017-1026, 1992.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 93/07

Recife, 17 de setembro de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 010789/2007-11

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEAA sobre o projeto de pesquisa intitulado **"Desnutrição pré-natal: repercussões sobre o desenvolvimento do sistema locomotor em ratos"**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEAA

ANEXO B - Documentação do Artigo 1

[View Letter](#)

Date: Dec 02, 2007
To: "Francis Canon" francis.canon@utc.fr
From: Isabel_correia@uol.com.br
Subject: Your Submission NUT-D-07-00192R2

Ms. Ref. No.: NUT-D-07-00192R2

Title: EFFECT OF A LOW-PROTEIN DIET DURING PREGNANCY ON THE
SKELETAL MUSCLE MECHANICAL PROPERTIES OF OFFSPRING RATS
Nutrition

Dear Doctor Canon,

I am delighted to inform you that your paper EFFECT OF A LOW-PROTEIN
DIET DURING PREGNANCY ON THE SKELETAL MUSCLE MECHANICAL
PROPERTIES OF OFFSPRING RATS has been accepted for publication in
Nutrition.

We look forward to publishing your paper and thank you for your
contribution and interest in Nutrition.

Kind regards,

M I.T.D Correia, MD, PhD
Regional Editor
Nutrition

ANEXO C - Documentação do Artigo 2

Title: CONSEQUENCES OF MATERNAL UNDERNUTRITION ON THE PASSIVE MECHANICAL PROPERTIES OF STRETCH MUSCLE IN RATS

Dear Dr Toscano,

Your submission has been received by the journal
Livestock Science.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/livsci/>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Please note also that the journal will continue to be published from 1st January 2006 under the new title Livestock Science. The title change will not affect the volume and issue numbering, such that the first volume of Livestock Science will be volume 99. The new title Livestock Science will not be affiliated with the European Association for Animal Production.

If your article is accepted, it is very likely that it will be published in Livestock Science. Please e-mail the Editorial Office at livest@elsevier.com if you have any queries regarding this.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Livestock Science