



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Nutrição.



**DESNUTRIÇÃO NEONATAL E DESENVOLVIMENTO NEUROMUSCULAR:
AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DA EXCITABILIDADE REFLEXA E DA
ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS.**

SEBASTIÃO ROGÉRIO DE FREITAS SILVA

Recife – 2007

**DESNUTRIÇÃO NEONATAL E DESENVOLVIMENTO NEUROMUSCULAR:
AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DA EXCITABILIDADE REFLEXA E DA
ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS.**

SEBASTIÃO ROGÉRIO DE FREITAS SILVA

Tese sandwich realizada com a Université de Technologie de Compiègne- UTC, e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Doutor em Nutrição.

Recife – 2007

Freitas Silva, Sebastião Rogério de
Desnutrição neonatal e desenvolvimento
neuromuscular: avaliação da maturação da
excitabilidade reflexa e da atividade locomotora em
ratos / *Sebastião Rogério de Freitas Silva. – Recife : O*
Autor, 2007.
xvi, 169 folhas ; il., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal – Desenvolvimento
neuromuscular. 2. Excitabilidade reflexa – Atividade
locomotora. I. Título.

614.95
674.13

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

UFPE
CCS2007-140

**DESNUTRIÇÃO NEONATAL E DESENVOLVIMENTO NEUROMUSCULAR:
AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DA EXCITABILIDADE REFLEXA E DA
ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS.**

SEBASTIÃO ROGÉRIO DE FREITAS SILVA

Tese aprovada com distinção em 06 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Carol Virginia Góis Leandro



Dr. Daniel Lambertz



Profa. Dra. Karla Mônica Ferraz Teixeira de Barros



Profa. Dra. Jairza Maria Barreto de Medeiros



Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos



Tese sandwich realizada entre a Universidade Federal de Pernambuco- UFPE e a Université de Technologie Compiègne- UTC (França), através do projeto de cooperação internacional CAPES/COFECUB n° 417/03.

ORIENTADORA

Doutora CHANTAL PEROT, professora do Departamento de Génie Biologique, UMR 6600, Université de Technologie de Compiègne (UTC) – França.

ORIENTADOR

Doutor RAUL MANHÃES DE CASTRO, professor Adjunto do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Este trabalho foi financiado pela CAPES/CNPq



Este texto representa um pouco do aprendizado recebido e das experiências vividas durante a execução deste trabalho de doutorado. E-mail escrito da França para o grupo NNI, em 12/11/2004.

Sete dias se passaram...

Imaginem só, hoje é sexta-feira, eu acabei de terminar o experimento. São 16:54h, estou acabado, mas estou feliz. Na sexta-feira da semana passada saí de casa pensando “hoje é o último dia antes do início da - manip - (experimento), vou fazer um treino para dar os últimos retoques”. Trabalhei com Nassimi, outro doutorando da professora Chantal, que nunca havia feito antes o teste de reflexo e que estava comigo para aprender, por recomendação da professora.

Eu falava para Nassimi o que ele deveria fazer. Ele fazia e conseguia respostas lindas no osciloscópio. Quando eu tentava, ao contrário de Nassimi, não conseguia. Fiquei estressado, parei o treino e disse para mim mesmo, “vou relaxar, eu sei fazer, preciso descansar”. Tratei de mandar um e-mail para meus amigos pedindo orações e esqueci da “manip” até a segunda-feira. Detalhe: eu já tinha feito todos os preparativos, era só chegar à segunda e fazer os testes.

Pois bem, a segunda chegou e eu já sabia que a professora Chantal não estaria lá para me ajudar. Ela estaria em Paris durante quase toda a semana, mas tudo bem. Eu ainda tinha M-jo, que é muito competente e conhece bem a “manip”. Eu só não contava que um amigo dela morresse no domingo e ela tivesse que ir ao velório exatamente na hora do experimento. “Caramba, eu estava ferrado!”. Fiz a “manip” sozinho, uma agonia desgraçada. Comecei às 8:10h e acabei de 12:30h, com um torcicolo danado por conta da tensão, mas pensando que aquele era o primeiro dia e que se desse alguma coisa errada eu teria os outros para compensar.

Na terça pensei que iria ser melhor, teria M-jo para ajudar. Comecei o experimento com ela e tudo estava indo bem até o último rato (PAE desnutrido DBR) soltar o eletrodo de referência e M-jo, ao tentar recolocar, arrancar a cauda do rato. “Que merda, logo um rato DBR!” Tive que parar a “manip”, rato estressado não tem boa resposta reflexa. Minha cabeça ficou fervendo.

Na quarta-feira tive aula de manhã com o professor Canon, trabalhei na “manip” apenas à tarde. Minha gente, este foi o pior dia que passei! Três horas e quarenta minutos dentro da sala com M-jo. Troquei um por um os cabos dos aparelhos, alterei a posição dos eletrodos, troquei eletrodos, mexi, puxei... Fiz uma coisa de cada vez, “como manda a metodologia científica” e nada de encontrar a resposta reflexa. Falei com Raul no MSN realmente estressado, ele me aconselhou e disse que eu estava aprendendo mais do que em todo tempo que já havia passado aqui.

Sai da faculdade de cabeça quente, fui comer um KEBAB, comprei uma garrafa de vinho, uma caixa de chocolate e um queijo Camambert. Total: cinco Euros. Cheguei em casa, chamei meu vizinho africano Marie-Londry para brindar e pedi para ele colocar uma música da terra dele. Comecei a dançar, o que me fez lembrar do meu pai, de quando nós ficávamos fazendo “macacada” e falando para mamãe: “eu sou africano, eu sou negão”. Também lembrei de Cecília, Pedro e todos que amo... Na metade do primeiro copo de vinho parei para dormir (21:30h). Finalmente eu conseguiria dormir, eu já estava queimado, ra ra ra ra ... Lá pelas 00:00 h o telefone tocou, era Raul perguntando como eu estava, ele tinha certeza que eu não estava dormindo por estar preocupado com a “manip”. Doce ilusão do meu chefe e amigo, até que eu estava dormindo bem ali. Depois do telefonema não conseguir dormir mais, fiquei repassando passo a passo o experimento, analisando o que poderia estar errado.

Cheguei à faculdade na quinta-feira, comecei a trabalhar, e tudo começou a dar certo. Terminei a sequência dos animais e a repeti com os que tinha dado errado. Chantal entrou no laboratório e ao me ver trabalhando disse que achava que eu iria terminar a semana bem melhor do que tinha começado. Verdade, ela tinha razão eu estava cansado mas estava feliz!

DEDICATÓRIA

A Ana Cecilia, esposa, companheira e amiga. O seu amor, a sua força e sua tolerância foram imprescindíveis para o meu êxito durante esta conquista, nunca esquecerei da sua manifestação de amor por mim enquanto estávamos passeando na floresta de Compiègne-Fr, amo muito você e espero envelhecer ao seu lado.

A Pedro Melo, que falou pela primeira vez a palavra “papai” a mim por telefone enquanto eu estava na França, o seu sorriso durante o nosso reencontro no aeroporto em Orly-Fr foi a certeza de que meu esforço não era em vão. A maior parte dos frutos desta conquista dedicarei a você.

A minha mãe, o seu amor incondicional, a sua coragem e sua dedicação a mim, foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, ter estado com a Senhora na França foi maravilhoso.

AGRADECIMENTOS

A Deus meu fiel protetor, tudo que sou e tenho agradeço a ti. As tuas misericórdias têm se multiplicado em vida, graças te dou Senhor.

Ao Professor Raul. Tenho uma dívida de filho com você e espero preservar este carinho e parceria profissional que guardo por você durante longos anos.

A Professora Chantal, uma mulher forte e competente pesquisadora. Seus ensinamentos marcarão minha vida.

A Karla, uma charmosa amiga. O seu carinho e companheirismo foram imprescindíveis para realização deste trabalho.

A Marie Jo, pela sua ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pelo seu acolhimento e amizade.

Aos amigos, Roberta Leite, Wylla Tatiana, Carol Leandro, Daniel Lambertz, Lucia Pires, Sônia Marinho, Ana Elisa, Raquel Aragão e Graça Paiva. Vocês contribuíram positivamente com minha vida ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A Noemia Rogério, Rute Maria, Paulo Luiz, Maria Rogério, Ana Rogério, M^a do Carmo Rogério, José Rogério, Ubiraci Rogério e Ubirajara Rogério, meus irmãos. Eu bem sei que minha vitória também é de vocês.

Aos amigos: Thiago Nobrega, José Cândido, Carlos Henrique, Keite Elen e Amanda estagiários do LAFINNT que contribuíram para realização da parte experimental deste trabalho.

As professoras Florisbela de Arruda Câmara, Zelyta Faro e Elizabeth Nascimento do Departamento de Nutrição. Obrigado pela confiança e pelo carinho depositados em mim é muito bom receber carinho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Nutrição-UFPE, pela atenção e respeito de vocês por mim, obrigado.

A Senhora Ruth Ferraz. Um presente tem o seu valor determinado pela delicadeza do gesto. Muito obrigado.

A França, Seu Paulino, Ana, e Hamilton (in memórian) pela ajuda e apoio no biotério.

**Em todo tempo ama ao teu amigo que na angustia terá um irmão.
Provérbios-17:17.**

PUBLICAÇÕES

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram produzidas as seguintes publicações:

➤ Congressos:

Freitas-Silva SR; Pérot C; Manhães de Castro R. ARE M-WAVE AND H-REFLEX AFFECTED BY NEONATAL MALNUTRITION?. Computer Methods in Biomechanics and Engineering, 1: 107-108, 2005.

Trabalho apresentado no 30º Congresso da Sociedade de Biomecânica, Bruxelas- Bélgica, de 14 a 16 de setembro de 2005.

Freitas-Silva SR; Pérot C; Manhães de Castro R & Barros KMFT. DESNUTRIÇÃO NEONATAL: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS REFLEXOS H E T EM RATOS.

Freitas-Silva SR; Barros KMFT; Toscano AE; Melo LA; Aragão RS; Manhães-de-Castro R; Santos WP; Portela NM; Melo CHS; Costa de Silva NTM & Souza RE. EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL UTILIZANDO UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.

Trabalho apresentado na XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia- São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006.

Campos Bezerra EK; Silva AAM; Freitas-Silva SR; França ET; Manhães-de-Castro R. CONSUMO ALIMENTAR EM RATOS: MANIPULAÇÃO DE DIETAS.

Freitas-Silva SR; Barros KMFT; Toscano AE; Nobrega TH M; Araujo-Filho JC; Aragão RS; Melo CHS; Ferreira LMP; Pérot C; Souza RE & Manhães-De-Castro R. EFFECTS OF PROTEIN SUPPLEMENTATION ON A DEVOID DIET IN THE EVOLUTION OF LOCOMOTOR ACTIVITY IN RATS.

Trabalhos apresentados na II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada na cidade do Recife- PE, de 01 a 06 de junho de 2007.

➤ Artigos:

Sebastião Rogério de Freitas Silva, Raul Manhães-de-Castro, Chantal Pérot. MALNUTRITION DURING BRAIN GROWTH ALTERS THE H- AND T-REFLEXES IN WEANING RATS. Submetido à revista Nutritional Research.

Freitas-Silva SR; Manhães-De-Castro R; Pérot C. IS REFLEX MATURATION IN RATS AFFECTED BY NEONATAL MALNUTRITION?. Submetido à revista Nutritional Neuroscience.

Freitas-Silva SR; Barros KMFT; Toscano AE; Nobrega TH M; Araujo-Filho JC; Aragão RS; Melo CHS; Ferreira LMP; Pérot C; Souza RE & Manhães-De-Castro R. EFFECTS OF PROTEIN SUPPLEMENTATION ON A DEVOID DIET IN THE EVOLUTION OF LOCOMOTOR ACTIVITY IN RATS. Submetido ao Journal of Motor Behavior.



SUMÁRIO

SUMÁRIO

SUMÁRIO	XI
SUMÁRIO DAS FIGURAS	XII
ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XVI
RÉSUMÉ	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUÇÃO GERAL (Avec version en français)	01
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
I. OS COMPONENTES DO REFLEXO DE ESTIRAMENTO: DESENVOLVIMENTO E ALTERAÇÕES IMPOSTAS PELA DESNUTRIÇÃO.	07
1. O fuso neuromuscular	07
1.1.1 Morfologia geral	07
1.1.2 Inervação sensorial do fuso neuromuscular	10
1.1.3 Inervação motora do fuso neuromuscular	11
1.2 Desenvolvimento do fuso neuromuscular	12
1.2.1 Desenvolvimento morfológico geral	12
1.2.2 Desenvolvimento da Inervação sensorial	13
1.2.3 Desenvolvimento da Inervação motora	14
1.3 Plasticidade do fuso neuromuscular e possível relação com a desnutrição	16
2. As unidades motoras	17
2.2.1 Características estruturais	17
2.2.2 Recrutamento das unidades motoras	19
2.2.3 Desenvolvimento da inervação muscular	23
2.3 Plasticidade das fibras musculares: possível relação da desnutrição com as propriedades das unidades motoras.	25
3. Atividade reflexa – resposta do músculo ao estiramento	29
3.1 Resposta do músculo a uma estimulação elétrica: Reflexo de Hoffmann	29
3.1.1 Curva de recrutamento da resposta M e do reflexo H	31
3.1.2 Resposta motora máxima (Mmax) e sua variabilidade	33
3.1.3 Reflexo Hoffmann (Hmax) e sua variabilidade	34
3.1.4 Reflexo H em modelos animais: adaptações	38
3.2 Resposta do músculo a uma estimulação mecânica: Reflexo Tendinoso	41
3. 2. 1 Variabilidade do reflexo T	43
3.3 Efeitos da desnutrição sobre a excitabilidade reflexa do músculo	47
II. A ATIVIDADE LOCOMOTORA	48
1. Desenvolvimento da atividade locomotora	48
2. Efeitos da desnutrição sobre a atividade locomotora	51
III. CONSIDERAÇÕES RELEVANTES SOBRE A DESNUTRIÇÃO	52
1. Desnutrição neonatal e suplementação de dietas	52

2. Hipótese do fenótipo protetor	55
IV. PROPOSTA DO ESTUDO - OBJETIVOS	58
1. Geral	58
2. Específicos	58
V. HIPÓTESES	60
VI. CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1	62
“Malnutrition during brain growth alters the H- and T-reflexes in weaning rats”	62
VII. CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2	78
“Is reflex maturation in rats affected by neonatal malnutrition?”	78
VIII. CAPÍTULO 4 - ARTIGO 3	101
“Effects of protein supplementation on a devoid diet in the evolution of locomotor activity in rats”.	101
IX. CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÕES	119
X. PERSPECTIVAS	131
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
XXII. ANEXOS	165

SUMÁRIO DAS FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do fuso neuromuscular.	08
Figura 2	Representação esquemática da reatividade da fibras nucleares BAG 1, BAG 2 e cadeia.	09
Figura 3	Resposta dos aferentes fusoriais Ia e II ao estiramento do músculo.	10
Figura 4	Reresentação esquemática do desenvolvimento sensorial do fuso neuromuscular.	15
Figura 5	Unidades motoras.	18
Figura 6	Esquema resumido das características funcionais das unidades motoras lentas e rápidas.	20
Figura 7	Somação da atividade de 3 unidades motoras por ativação sucessiva em função do nível de força requisitado.	22
Figura 8	Frequência de disparos de unidades motoras dos extensores dos dedos registrados no momento de uma contração isométrica voluntária.	22
Figura 9	Percentual de fibras do músculo solear do rato inervadas por mais de um axônio em diferentes idades.	24
Figura 10	Histograma da distribuição pela área e tipos de fibras do músculo gastrocnêmio do rato.	28
Figura 11	Esquema simplificado dos componentes do reflexo H.	30
Figura 12	Eletromiografia do reflexo H.	31
Figura 13	Curva de recrutamento do reflexo H e resposta M.	32
Figura 14	Parâmetros avaliados no reflexo H e respostas M.	32
Figura 15	Efeito da inibição pré-sináptica sobre o reflexo H solear.	35
Figura 16	Redução do reflexo H em diferentes posições pela relação Hmax/Mmax de indivíduos jovens e idosos.	36
Figura 17	Regressão linear e amplitude do potencial sensorial pelo aumento da idade em ratos.	39
Figura 18	Esquema simplificado dos componentes do reflexo T.	42
Figura 19	Sinal EMG do reflexo T.	43
Figura 20	Relação entre a latência do reflexo T no triceps sural e a idade de pré-adolescentes.	45
Figura 21	Relação T/Mmax e a idade de pré-adolescentes nos músculos solear e triceps sural.	46
Tabela 1	Evolução da atividade locomotora de ratos controles e desnutridos aos 7, 14 e 21 dias de vida.	52

ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervoso central
γ_d	Motoneurônios fusomotores γ dinâmicos
β_d	Motoneurônios β dinâmicos
γ_s	Motoneurônios fusomotores γ estáticos
β_s	Motoneurônios β estáticos
A	Amplitude
AL	Atividade locomotora
ANOVA	Análise de variância
C17	Caseína 17%
C8	Caseína 8%
DAP	Despolarização do aferente primário
DBR	Dieta básica regional
EMG	Eletromiograma
EPSPs	Potenciais monossinápticos pós-sinápticos excitatórios.
ER	Excitabilidade reflexa
FF	UMs de contração rápidas e pouco resistentes à fadiga
FR	UMs de contração rápida e resistentes à fadiga
H	Hoffmann
H/Mmax	Reflexo H expresso em fração da Mmax
Hmax	Reflexo Hmax
Ia	Fibras aferentes primárias
II	Fibras aferentes secundárias
L	Latência
M	Resposta motora direta
MAP	Potencial de ação muscular
Mmax	Resposta motora máxima
MyHC	Miosina de cadeia pesada
NNI	Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade
pps	Pulsos por segundo
PSI	Inibição Pré-sináptica
RH	Reflexo Hoffmann
RT	Reflexo Tendinoso
S	UMs de contração lenta
SMP	Suspensão dos membros posteriores
SN	Sistema nervoso
T	Reflexo tendinoso
UM	Unidade motora



RESUMO

RESUMO

Foram averiguados os efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento da excitabilidade reflexa (ER) e da atividade locomotora (AL) em ratos. Foram realizados três estudos: 1- Efeitos da desnutrição sobre reflexo Hoffmann (H) e reflexo Tendinoso (T) ao desmame. Observamos que a relação H_{max}/M_{max} foi menor em desnutridos. A relação T_{max}/M_{max} foi menor nos tratados com dieta básica regional (DBR) que nos controles. 2- A maturação reflexa é afetada pela desnutrição? Investigamos, entre o desmame e a idade adulta, a maturação da ER. Nos desnutridos houve redução na latência do Reflexo H e no índice de velocidade de condução nervosa, mas não da ER em todas as idades estudadas, exceto do Reflexo T aos 21 dias. 3-Efeitos da suplementação protéica de dieta deficiente sobre evolução da AL. Avaliamos a suplementação de dieta deficiente durante aleitamento. Houve redução de peso nos desnutridos independentemente da suplementação protéica. Na AL, observamos menor velocidade e percurso no 14º dia em desnutridos DBR, mas não nos suplementados. A potência muscular aos 21 dias de idade foi menor nos desnutridos, embora tenha sido maior naqueles suplementados. Concluimos que: A desnutrição afeta a ER avaliada no desmame e parece não alterar de maneira permanente a ER em ratos recuperados após o desmame; A suplementação protéica da DBR minimiza os efeitos negativos desnutrição sobre o desenvolvimento somático e locomotor.

Palavras Chaves: Desnutrição neonatal; Excitabilidade reflexa; Atividade locomotora; Rato.

RÉSUMÉ

Les effets de la dénutrition néonatale sur le développement de l'excitabilité reflexe (ER) et de l'activité locomotrice (AL) chez les rats ont été évalués. Trois études ont été réalisées : 1- Effets de la dénutrition sur les reflexes de Hoffmann (H) et Tendineux (T). Nous avons trouvé que les rapports H_{max}/M_{max} et T_{max}/M_{max} étaient diminués pour le groupe dénutri. 2-La maturation des reflexes est-elle affecté par la dénutrition ? Ce travail a étudié la maturation de l'ER dès l'âge du sevrage jusqu'à l'âge adulte. Les dénutris ont présenté une réduction de la latence du réflex H et de l'index de vitesse de conduction nerveux, mais pas de changements de l'ER dans toutes les âges, exception fait le reflex T à 21 jours. 3- Effets de la supplementation protéique d'une diète déficiente sur l'évolution de l'AL. Nous avons évalué la supplementation d'une diète déficiente pendant l'allaitement. Le poids corporel était réduit chez les dénutris, malgré la supplementation protéique. En ce qui concerne l'évaluation de l'AL, la vitesse et la distance parcourue étaient réduites chez les dénutris, mais pas chez les supplémentés. La puissance musculaire était réduite chez les dénutris, mais de façon moins prononcée chez les supplémentés. Nous avons conclu : que la dénutrition pendant l'allaitement affecte l'ER à l'âge du sevrage ; la dénutrition n'altère pas de manière permanente l'ER si la récupération nutritionnel est induite après la période du sevrage ; la supplementation protéique de la DBR réduit ses effets indésirables de la dénutrition sur le développement corporel et locomoteur.

Mots clés : Dénutrition néonatale ; Excitabilité reflexe ; Activité locomotrice ; Rat.

ABSTRACT

The effects of neonatal malnutrition on the development of reflex excitability (RE) and locomotor activity (LA) were evaluated. Three studies were realised : 1- The effect of denutrition on the Hoffmann (H) and tendon (T) reflex. For this study, we found that the ratio Hmax/Mmax and Tmax/Mmax were decreased for the malnutrition group. 2-Is reflex maturation affected by denutrition ? This study quantified the maturation of RE from weaning up to adulthood in rats. The denutriton group showed a reduction in latency of the H reflex and the nerv conduction velocity index, but no changes in RE at all ages. Exceptional, the T reflex was modified at the age of 21 days. 3-The effect of protein supplementation on the evolution of LA. For this study, we evaluated the protein supplementation of a defective diet during the breath feeding period. Although the supplemenation with protein, body mass was reduced in the malnutrition group. As for LA evaluation, the velocity and the distance were reduced in the malnutrition group, but not in the protein supplemented group. Muscular power was reduced in the denutrition group, but this reduction was less pronounced in the protein supplemented goup. In conclusion : Malnutrition during the breath feeding period affect RE at weaning ; denutrition did not alter in a permanent way RE, when nutritional recuperation starts after the weaning period ; the protein supplementation for the DBR diet reduced the undesirable malnutrition effects on the body and locomotor developpement.

Keyword : Neonatal malnutrition ; Reflex excitability ; Locomotor activity ; Rat.



INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A Universidade Federal de Pernambuco - UFPE/Brasil, através do Departamento de Nutrição e do grupo de pesquisa *Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade* / NNI (Ref: UFPE.0217), tem se dedicado ao longo dos anos ao estudo, em modelos animais, dos efeitos de manipulações dietéticas e/ou farmacológicas durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso (SN), sobre parâmetros comportamentais e imunológicos.

Tais estudos têm produzido diversos trabalhos publicados em revistas indexadas, discutindo aspectos como a maturação de indicadores de desenvolvimento somático e neural (DEIRÓ *et al.*, 2004), a maturação da atividade locomotora (BARROS *et al.*, 2006) o comportamento depressivo (MENDES *et al.*, 2001), e o comportamento agressivo (BARRETO MEDEIROS *et al.*, 2004). Estes estudos experimentais demonstram que a desnutrição constitui, para o organismo vivo, uma agressão com múltiplas conseqüências. Além disso, contribuem para estabelecer o embasamento de estratégias de prevenção e combate às seqüelas impostas pela desnutrição. Enfim, em países subdesenvolvidos como o Brasil, a desnutrição ainda pode ser considerada um problema grave de saúde pública (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

Por outro lado, a Universidade de Tecnologia de Compiègne - UTC/França, através do Departamento de Biomecânica e Engenharia Biomédica - UMR6600, tem uma vasta experiência no estudo do tema Neuromecânica e Sinais Eletrofisiológicos, com ênfase para a plasticidade muscular e controle motor. Desta experiência resultaram a concepção e a elaboração de equipamentos, como ergômetros específicos para aquisição de dados em humanos e animais, necessários ao estudo de demandas funcionais de interesse

(hipoatividade, hiperatividade, envelhecimento, desnutrição etc), produzindo vários trabalhos científicos de relevante importância (PÉROT & ALMEIDA-SILVEIRA, 1994; ALMEIDA-SILVEIRA *et al.* 1996; ANDERSON *et al.*, 1999; LAMBERTZ *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Assim, este trabalho se insere no contexto do projeto CAPES/COFECUB (nº 417/03) de cooperação internacional entre a UFPE e a UTC, que objetiva propor uma melhor avaliação dos impactos da desnutrição sobre os sistemas orgânicos, com destaque para o sistema neuromuscular. Nosso trabalho se propõe a avaliar os aspectos do desenvolvimento da excitabilidade reflexa e do controle motor em ratos desnutridos durante o período neonatal. Apesar de importantes, são raros os trabalhos que tratam deste assunto numa perspectiva direcionada para o estudo da maturação reflexa em animais jovens até a idade adulta.

No primeiro capítulo desta tese, tratamos da revisão bibliográfica referindo alguns aspectos relacionados ao desenvolvimento neuromuscular, a quantificação da atividade reflexa e do comportamento locomotor e finalmente, dos impactos da desnutrição neonatal sobre o organismo.

O segundo capítulo é dedicado à apresentação dos resultados referentes ao trabalho relacionado aos efeitos da desnutrição neonatal sobre excitabilidade reflexa em ratos ao desmame. Este trabalho levou a preparação do artigo intitulado: **“Malnutrition during brain growth alters the H- and T-reflexes in weaning rats”** e submetido à revista Nutritional Research.

No terceiro capítulo, abordamos os aspectos relacionados a maturação da excitabilidade reflexa em ratos desnutridos durante o período neonatal, o que também

conduziu à preparação do artigo intitulado: **“Is reflex maturation in rats affected by neonatal malnutrition?”**, submetido à revista Nutritional Neuroscience.

O quarto capítulo é consagrado ao estudo da atividade locomotora de ratos desnutridos submetidos a uma dieta suplementada com proteína e conduziu à preparação do artigo intitulado: **“Effects of protein supplementation on a devoid diet in the locomotor activity evolution in rats”** que foi submetido ao Journal of Motor Behavior.

O quinto Capítulo é consagrado à discussão geral e conclusões, e a apresentação das perspectivas.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'Université Fédérale de Pernambuco – UFPE/Brésil, par son Département de Nutrition et son groupe de recherche Nutrition, Neuropsychopharmacologie et Immunité /NNI (Ref : UFPE.0217), s'est intéressée depuis de longues années à l'étude, chez l'animal, des effets de manipulations diététiques et/ou pharmacologiques pendant la période critique du développement du système nerveux (SN), sur des paramètres comportementaux et immunologiques.

Ceci a amené la production de divers articles publiés dans des revues indexées où sont discutés des aspects comme la maturation des indicateurs du développement somatique et neural (DEIRO *et al.*, 2004), l'évolution de l'activité locomotrice (BARROS *et al.*, 2006), le comportement dépressif (MENDES *et al.*, 2001) et le comportement agressif (BARRETO MEDEIROS *et al.*, 2004). De telles études expérimentales ont ainsi démontré que la dénutrition constituait, pour l'organisme vivant, une agression aux multiples conséquences. Ces études ont contribué à l'établissement d'une base de stratégies de prévention et de combat des séquelles imposées par la dénutrition. Enfin, dans des pays en voie de développement comme le Brésil, la dénutrition reste toujours un problème grave de santé publique.

D'autre part, l'Université de Technologie de Compiègne-UTC/France, par son Unité de Biomécanique et Génie Biomédical (UMR CNRS 6600), possède une vaste expérience dans l'étude d'un thème associant Neuromécanique et Signaux Electrophysiologiques en se focalisant, notamment, sur la plasticité musculaire et le contrôle moteur.

Ceci a entraîné la conception et l'élaboration d'équipements spécifiques comme des ergomètres et des dispositifs de réflexologie pour le recueil de données - tant chez l'Homme que chez l'animal – lors de variations de la demande fonctionnelle (hypoactivité, hyperactivité, vieillissement, dénutrition etc). Ceci a amené la publication d'articles dans des revues indexées (PÉROT & ALMEIDA SILVEIRA, 1994; ALMEIDA SILVEIRA *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1999; LAMBERTZ *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Ainsi le présent travail s'insère dans le contexte du projet CAPES/COFECUB (n° 417/03) de coopération internationale entre l'UFPE et l'UTC, dont l'objectif est de proposer une meilleure évaluation des effets de la dénutrition sur les systèmes organiques et notamment le système neuromusculaire.

Notre travail se propose d'étudier, chez le rat dénutri pendant la période néonatale, le développement de l'excitabilité réflexe et du contrôle moteur. Malgré l'importance de cette thématique, rares sont les travaux s'y référant dans la perspective du suivi de la maturation des réflexes chez l'animal, de la naissance à l'âge adulte.

Le premier chapitre de cette thèse a trait à une étude bibliographique portant sur quelques aspects du développement neuromusculaire, la quantification des activités réflexes et du comportement locomoteur et finalement les impacts de la dénutrition néonatale sur l'organisme.

Le deuxième chapitre est dédié à la présentation des résultats ayant trait aux effets de la dénutrition néonatale sur l'excitabilité réflexe des rats sevrés. Ces résultats ont amené à la preparation de l'article intitulé "**Neonatal malnutrition change the H- and T-reflexes in weaning rats**" est soumis à Nutritional Research.

Dans le troisième chapitre nous abordons les aspects de la maturation de l'excitabilité réflexe chez le rat dénutri pendant la période néonatale. Ce travail a amené à

la préparation de l'article intitulé: **“Is reflex maturation in rats affected by neonatal malnutrition?”** est soumis à Nutritional Neuroscience.

Le quatrième chapitre comporte l'étude de l'évaluation de l'activité locomotrice chez le rat dénutri soumis à une diet supplementet avec proteine et a conduit à la preparation de l'article intitulé: **“ Effects of protein supplementation on a deficient diet in the evolution of locomotor activity in rats”** est soumis au Journal of Motor Behavior.

Le cinquième chapitre est consacré à la discussion générale et conclusions, et à la présentation des perspectives.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. OS COMPONENTES DO REFLEXO DE ESTIRAMENTO: DESENVOLVIMENTO E ALTERAÇÕES IMPOSTAS PELA DESNUTRIÇÃO.

1. O fuso neuromuscular:

1.1.1 Morfologia geral

Os fusos neuromusculares são receptores mecânicos capazes de detectar a variação do comprimento do músculo, bem como a velocidade desta variação (BARKER *et al.*, 1973; HUNT, 1990; MAIER, 1997). Um fuso neuromuscular consiste de um número variável de fibras musculares intrafusais, que são inervadas por axônios sensoriais e motores, e está disposto paralelamente às fibras musculares extrafusais (BARKER *et al.*, 1973; MAIER, 1997). As fibras intrafusais são revestidas por uma cápsula fibro-conjuntiva que permite o seu isolamento mecânico e elétrico em relação às fibras extrafusais (BARKER 1974; MAIER, 1997). No seu interior, a cápsula é essencialmente preenchida pelo ácido hialurônico, que confere ao seu interior um potencial negativo importante para o funcionamento dos aferentes fusoriais (FUKAMI, 1986). Através do controle da variação das espécies iônicas no espaço intracapsular, a cápsula fusorial contribui para o melhor funcionamento das terminações sensoriais (FUKIMA, 1986). O fuso neuromuscular é dividido em três regiões: a região equatorial, a região justa equatorial e a região polar (Figura 1).

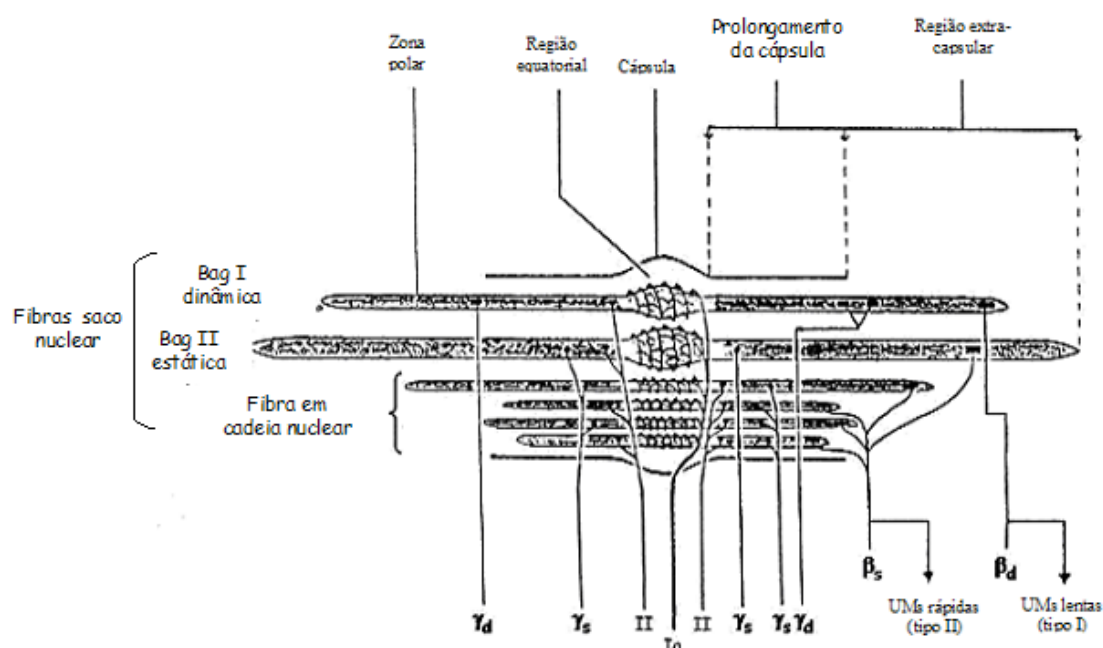


Figura 1. Representação esquemática do fuso neuromuscular; fibras intrínsecas em saco e cadeia nuclear; Ia, axônio sensorial primário; II, axônio sensorial secundário; inervação gama (γ) e beta (β) (Barker, 1973).

Fibras intrínsecas

É possível identificar três tipos de fibras intrínsecas: as fibras em saco nuclear Bag I (dinâmicas), as fibras em saco nuclear Bag II (estáticas) e as fibras em cadeia nuclear (SOUKUP, 1976; HUNT, 1990) (Figura 1). Estes três tipos de fibras correspondem parcialmente às fibras extrínsecas do tipo I, IIA e IIB respectivamente (OVALLE & SMITH, 1972). As fibras intrínsecas em sua região equatorial são preenchidas pelos núcleos celulares e nas regiões polares são encontradas as proteínas contráteis actina e miosina. As fibras em saco nuclear Bag I apresentam um tempo de contração mais lento e uma força de contração menor que as fibras Bag II (BODY, 1976; WALRO & KUCERA, 1990). As fibras em cadeia nuclear são menores, menos espessas e possuem um número menor de núcleos alinhados na região central da fibra. Elas apresentam características das fibras em saco Bag II revelando as

mesmas propriedades mecânicas das fibras rápidas (BOYD, 1976; GLADDEN, 1976). A composição das fibras intrafusais varia de acordo com músculo avaliado, a sua função e tipo de unidade motora (SCOTT & YOUNG, 1987).

Conteúdo de miosina das fibras intrafusais

Ao contrário do que se observa nas fibras extrafusais do músculo, que apresentam uma atividade mATPásica de maneira uniforme sobre toda a fibra (BROOKE & KAISER, 1970). As fibras intrafusais não expressam uniformemente a atividade mATPásica ao longo de toda a sua extensão, e isto foi verificado no rato (KHAN & SOUKUP, 1988), no gato (KUCERA & WALRO, 1989) e no homem (ERIKSSON *et al.*, 1994). Também é possível determinar as diferentes isoformas de miosina (MyHC: Myosin Heavy Chain): vários estudos de imunohistoquímica permitem estabelecer uma cartografia precisa das isoformas de MyHC contidas nas partes contráteis das fibras intrafusais.

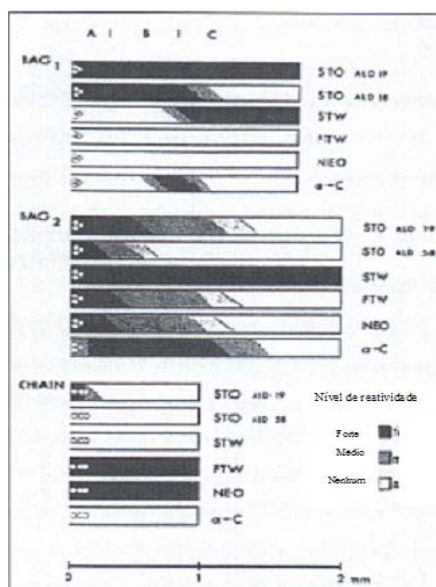


Figure 2. Representação esquemática do perfil de reatividade das fibras nucleares BAG 1, BAG 2 e cadeia (CHAIN) dos fusos neuromusculares do músculo solear do rato adulto face os anticorpos MyHC lentos (STO= Slow Tonic e STW= Slow Twitch ou MyHC do tipo I), rápido (FTW=Fast Twitch), neonatal (NEO) e alfa cardíaca (α -C). Cada fibra é representada a partir da região equatorial até um dos pólos. (Pedrosa-Domellöf *et al.*, 1991)

A figura 2 resume o conteúdo de MyHC das fibras intrafusais dos fusos neuromusculares do músculo solear de ratos adultos. Cada fibra intrafusar tem seu próprio e único painel de expressão de MyHC e sua própria distribuição longitudinal de MyHC. Isto

1.1.2 Inervação sensorial do fuso neuromuscular

The figure consists of two side-by-side graphs. The left graph is titled 'Estiramento em rampa' (Ramp stretch). The top trace shows a horizontal line followed by a linear ramp up to a plateau. The bottom trace shows the firing rate of Ia afferents (top) and II afferents (bottom). Ia firing rate increases linearly during the ramp and remains high during the plateau. II firing rate is a constant series of vertical lines. The right graph is titled 'Estiramento sinusoidal' (Sinusoidal stretch). The top trace shows a sinusoidal wave. The bottom trace shows the firing rate of Ia afferents (top) and II afferents (bottom). Ia firing rate follows the sinusoidal wave, peaking during the upward phase and dipping during the downward phase. II firing rate is a constant series of vertical lines.

Figura 3: Resposta dos aferentes fusoriais ao estiramento do músculo. Os disparos dos aferentes Ia e II são observados nos dois tipos de estiramento de grande amplitude, aplicados na ausência da atividade fusomotora. A frequência dos disparos do aferente Ia e II cresce com a amplitude do estiramento. Durante a fase dinâmica do estiramento, os disparos do aferente Ia apresentam grandes variações (Matthews, 1964).

1.1.3 Inervação motora do fuso neuromuscular

Dois grupos de fibras nervosas eferentes realizam a inervação motora do fuso neuromuscular, os motoneurônios fusomotores γ e os motoneurônios esqueléticos-fusomotor β . Os motoneurônios fusomotores γ são de pequeno diâmetro (2 a 8 μm) e com baixa velocidade de condução. São classificados por parâmetros histofisiológicos (CROWE & MATTHEWS, 1964; HUNT, 1990) em dois grupos: os motoneurônios fusomotores γ dinâmicos (γ_d) que inervam seletivamente as fibras em saco nuclear do tipo I e terminam ao nível da região polar; os motoneurônios fusomotores γ estáticos (γ_s) que inervam tanto as fibras em cadeia nuclear quanto as fibras em saco nuclear do tipo II e terminam ao nível da região *juxta-equatorial* (Figura 1).

Os motoneurônios esqueléticos-fusomotores β são neurônios de maior diâmetro (8 a 12 μm) e apresentam suas terminações localizadas nas extremidades das fibras intrafusais (BARKER *et al.*, 1970). De acordo com a velocidade de condução e o tipo de fibras que os inervam, os motoneurônios β também são divididos em: motoneurônios β dinâmicos (β_d) e motoneurônios β estáticos (β_s) (EMONET-DENAND *et al.*, 1977). Os motoneurônios β_d apresentam uma velocidade de condução lenta e inervam as fibras em saco nuclear do tipo I e as fibras extrafusais de contração lenta. Os motoneurônios β_s estáticos têm uma velocidade de condução mais rápida e inervam as fibras em cadeia nuclear, as fibras em saco nuclear do tipo II e as fibras extrafusais do tipo rápido.

Os neurônios fusomotores têm a função de manter as terminações anulo-espirais dos aferentes sensoriais, em posição que lhe permita responder à variação de comprimento do músculo mesmo durante uma contração (GRANIT, 1975). A estimulação dos motoneurônios γ_s induz à contração nas zonas polares que mantém abertas as terminações anulo-espirais Ia,

aumentando sua sensibilidade à variação do comprimento, embora diminua sua sensibilidade dinâmica (PROSKE, 1997). Além disso, a estimulação dos motoneurônios γ_d aumenta a sensibilidade das terminações, entretanto de maneira oposta à realizada pelos motoneurônios γ_s (PROSKE, 1997). Os motoneurônios γ_d inervam seletivamente as fibras tipo I e, contrariamente aos motoneurônios γ_s , sua estimulação elétrica promove uma fraca contração das regiões polares, aumentando o número das pontes de actina e miosina formadas e conseqüentemente a rigidez das fibras intrafusais, sem deformar a parte central sensorial da fibra (PROSKE, 1997). Este aumento da tensão intrafusar é responsável pelo aumento da sensibilidade dinâmica das fibras intrafusais (CROWE & MATTHEWS, 1964). Quando os motoneurônios γ_d e γ_s são ativados simultaneamente, o efeito estático prevalece.

A estimulação dos motoneurônios β_d provoca um aumento da resposta dinâmica dos aferentes Ia, enquanto que uma estimulação dos motoneurônios β_s promove um aumento da sensibilidade estática dos aferentes Ia e II, sem modificar a resposta dinâmica das fibras Ia. Assim, os neurônios fusomotores permitem ao fuso neuromuscular conservar suas propriedades sensoriais em qualquer que seja a condição de contração muscular. (HULLIGER *et al.*, 1977a, 1977b; MATTHEWS, 1981).

1.2 O desenvolvimento do fuso neuromuscular

1.2.1 Desenvolvimento morfológico geral

O período de aparecimento dos fusos musculares durante o desenvolvimento varia de acordo com o músculo analisado e a espécie estudada (MAIER, 1997). Os animais mais freqüentemente utilizados para o estudo do fuso neuromuscular são o camundongo, o rato e o gato, que apresentam períodos de gestação correspondentes a 19-21, 21 e 63 dias respectivamente. O conjunto das fibras intrafusais está completo ao nascimento no

camundongo (KUZEKA & ONTELL, 1981) e no gato (MILBURN, 1984). No rato isto ocorre por volta do 4º dia pós-natal (MILBURN, 1973; KUCERA & WALRO, 1990). A primeira fase de desenvolvimento do fuso neuromuscular é a de formação, havendo o agrupamento dos miotubos precursores das fibras intrafusais, que exprimem as mesmas isoformas de miosina de cadeia pesada que os miotubos precursores de fibras extrafusais (KUCERA & WALRO, 1990). A segunda fase é a de transformação dos miotubos precursores das fibras intrafusais em fibras em saco nuclear tipo I, tipo II e em cadeia nuclear exprimindo as isoformas de miosina características do fuso (KUCERA & WALRO, 1989a). O surgimento das fibras intrafusais do tipo saco nuclear é um evento precoce, que ocorre entre 1-3 dias após a chegada do axônio sensorial (KUZEKA & ONTELL, 1981; KUCERA *et al.*, 1988). A terceira e última fase é a de maturação das fibras intrafusais, onde elas adquirem as características histoquímicas e imunohistoquímicas das fibras intrafusais adultas (KUCERA & WALRO, 1989b).

Inicialmente, os miotubos intrafusais são tão grandes ou maiores que os miotubos extrafusais (MAIER & ELDRED, 1974; SWATLAND, 1974), mas com o crescimento pós-natal o tamanho das fibras intrafusais é rapidamente ultrapassado pelas fibras extrafusais (MAIER & ELDRED, 1974; MAIER, 1993). A maturação dos fusos neuromusculares dos músculos de ratos se estendem do 17-18 dias de gestação até a 4ª semana pós-natal (ZELENA, 1964). Em ratos idosos o número de fibras extrafusais se reduz, mas o número de fibras intrafusais por fuso neuromuscular permanece constante (HARTUNG & ASMUSSEN, 1988).

1.2.2 Desenvolvimento da Inervação Sensorial

O desenvolvimento da inervação sensorial é muito importante para formação do fuso neuromuscular, uma vez que os miotubos intrafusais não podem ser identificados antes da

chegada dos aferentes primários (MAIER, 1997). Inicialmente, uma rede de axônios amielinizados (LANDON, 1972; KUCERA & WALRO, 1988), de maior e menor calibre, movem-se na direção de uma suposta fibra intrafusar indiferenciada e dos mioblastos (ZELENA, 1957). Vários axônios fazem contato com osmiotubos e o ponto de junção mio sensorial entre o maior aferente (futuro aferente primário Ia) e omiotubo intrafusar (futura fibra intrafusar tipo II) será a região equatorial. Após o contato, vários núcleos celulares aparecem no centro domiotubo intrafusar tipo 2, começando a formar a região equatorial. Além disso, os mioblastos se alinham para formar omiotubo intrafusar tipo I. Os aferentes secundários também fazem contato com osmiotubos distais e o aferente primário começa a se enrolar em torno dosmiotubos intrafusais (ZELENA, 1964, KUZKA & ONTELL, 1981; KUCERA & WALRO, 1988). Estudos sugerem que os aferentes fusoriais competem pelosmiotubos intrafusais disponíveis (KUCERA & WALRO, 1989). No músculo solear do rato, são observados vários aferentes durante o desenvolvimento e mesmo após o nascimento (KUCERA & WALRO, 1989). As fibras intrafusais em roedores recebem sua inervação sensorial na ordem em que são formadas. As fibras em saco nuclear do tipo II sempre são as primeiras a serem inervadas (KUCERA & WALRO, 1994). A ordem padrão de ramificação dos aferentes primários e secundários (KUCERA & WALRO, 1988) e a base morfológica da junção mio sensorial se estabelecem antes da primeira semana pós-natal (LANDON, 1972; KUCERA & WALRO, 1988). A figura 4 apresenta uma representação esquemática dos principais eventos nos estágios iniciais do desenvolvimento sensorial.

1.2.3 Desenvolvimento da Inervação motora

Em roedores, os terminais motores não são observados até depois dos primeiros axônios sensoriais terem feito contato com as fibras intrafusais (MILBURN, 1973; KUZKA & ONTELL, 1981). Assim como os axônios sensoriais, os axônios fusomotores gama

inervam as fibras intrafusais na ordem com que elas são formadas, a fibra em saco nuclear tipo II é sempre a primeira a ser innervada (KUCERA & WALRO, 1989).

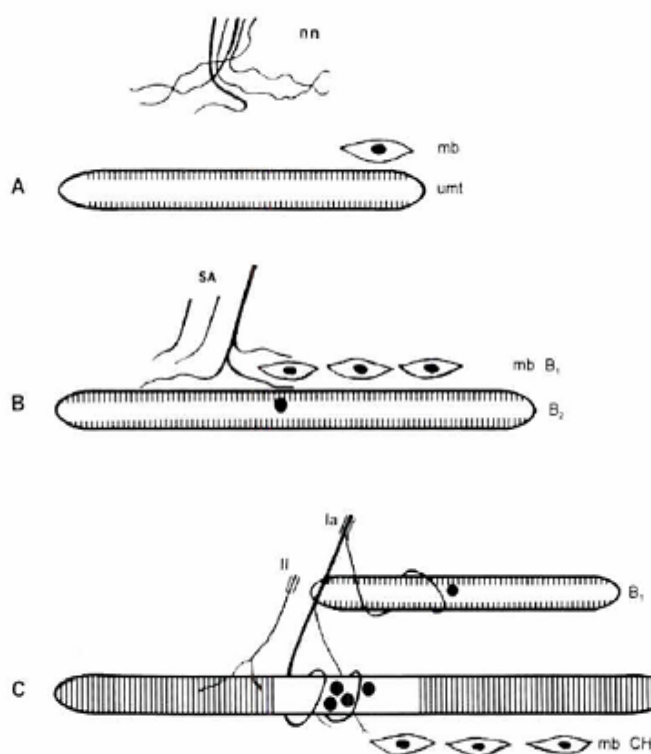


Figura 4. Representação esquemática dos principais eventos nos estágios iniciais do desenvolvimento sensorial. Uma rede amielinizada (nn); miotubos intrafusais indiferenciados (umt); mioblastos (mb); axônios sensoriais (SA); miotubo primário intrafusai (B_1); miotubo secundário intrafusai (B_2); aferente primário (Ia); aferente secundário (II); mioblastos que originarão miotubos intrafusais do tipo cadeia nuclear (mb CH). A – Aproximação dos axônios amielinizados em relação ao miotubo intrafusai indiferenciado e os mioblastos. B – Contato dos axônios sensoriais com o miotubo intrafusai indiferenciado e os mioblastos, os núcleos celulares começam a aparecer no centro do miotubo intrafusai. C – O aferente primário Ia começa a formar uma espiral em torno do miotubo intrafusai e o aferente secundário faz contato com o miotubo mais distal em relação a primeira região sensorial (MAIER, 1997).

Do vigésimo dia de vida embrionária até o nascimento, os terminais motores no rato são essencialmente limitados às fibras em saco nuclear tipo II (KUCERA & WALRO, 1988a), ou elas podem ser completamente ausentes (LANDON, 1972). Durante o período neonatal, aproximadamente 4 dias após o aparecimento dos aferente primário, a innervação eferente se estende para as fibras em saco nuclear tipo I e tipo II. As fibras em cadeia nuclear no rato são bem supridas com axônios fusomotores por volta do quarto dia pós-natal (KUCERA & WALRO, 1988b). No rato, em nenhum momento existe sobreposição entre as terminações sensoriais e motoras, enquanto os axônios motores são amielinizados ao quarto dia pós-natal (KUCERA & WALRO, 1988b). Contudo, no gato isto parece existir

(MILBURN, 1984): prolongamentos das células de Schwann cobrem as terminações motoras assim que elas são reconhecidas no fuso neuromuscular (MILBURN, 1984).

Os motoneurônios gama entram no fuso neuromuscular junto com as fibras sensoriais, na região equatorial. Após sua entrada, a cápsula do fuso neuromuscular separa os axônios gama dos aferentes sensoriais formando agrupamentos motores, sendo que cada agrupamento contém vários axônios. Estes agrupamentos progressivamente vão se aproximando das regiões polares que são usualmente supridas por diferentes agrupamentos motores (KUCERA & WALRO, 1988b). Nos estágios iniciais do desenvolvimento, as fibras intrafusais tipo II recebem um número maior de terminais motores que as fibras tipo I, mas por volta do quarto dia pós-natal esta distribuição se inverte (KUCERA & WALRO, 1988a). Tipicamente, as fibras em cadeia nuclear não adquirem mais que um axônio motor por região polar. Devido ao crescimento longitudinal pós-natal das fibras intrafusais, os terminais motores são mais removidos da região equatorial no fuso neuromuscular adulto. Encontram-se mais axônios motores no fuso neuromuscular imaturo do que no adulto, indicando que ocorre a retração de alguns axônios (KUCERA & WALRO, 1988), possivelmente devido à competição por miotubos disponíveis.

1.3 Plasticidade do fuso neuromuscular e possível relação com a desnutrição.

Alguns estudos têm demonstrado que o fuso neuromuscular pode se adaptar a diferentes situações. Mudanças na estrutura das fibras intrafusais podem ser produzidas pela desnervação (ZELENA, 1957), pela imobilização (JOZSA *et al.*, 1988) e pela exposição à microgravidade simulada (DE-DONCKER *et al.*, 2002). Um número menor de trabalhos têm demonstrado um aumento nos disparos dos aferentes fusoriais, em resposta à contração muscular após imobilização (GIOUX & PETIT, 1993) ou exposição à microgravidade

simulada (DE- DONCKER *et al.*, 2002). Estes estudos sugerem que mudanças na rigidez passiva do músculo contribuem para estas alterações nos aferentes fusoriais. Rosant et al. (2006a) observaram um aumento nos disparos dos fusos neuromusculares do músculo solear de ratos, após 21 dias de exposição à microgravidade simulada, sugerindo que isto deve ter ocorrido devido a adaptações tanto ao nível fusorial, quanto ao nível da rigidez da unidade músculo-tendinosa. Igualmente, os efeitos do envelhecimento sobre o fuso neuromuscular são pouco documentados. Em humanos, um estudo menciona um aumento da espessura capsular do fuso neuromuscular de idosos (SWASH & FOX, 1974). Alterações na sensibilidade estática dos aferentes fusoriais de ratos idosos também foram observadas (MIWA *et al.*, 1995). Liu et al. (2005) estudaram o bíceps braquial de humanos idosos, e encontraram poucas fibras em cadeia nuclear e muitas mudanças no conteúdo intrafusar de MyHC. Mais recentemente, um estudo documentou alterações no fuso neuromuscular de ratos idosos e demonstrou que alterações nas propriedades elásticas dos elementos músculo-tendinosos produzidas pelo envelhecimento modificam a ativação do fuso neuromuscular (ROSANT *et al.*, 2006b).

Finalmente, alguns estudos tenham relatado alterações no sistema muscular em decorrência da desnutrição, como alteração do retículo sarcoplasmático e da mitocôndria (PARK *et al.*, 1983). Também é relatada uma redução da secção transversa e um atraso na diferenciação dos tipos de fibras musculares no gastrocnêmio em ratos desnutridos no período do aleitamento (SILVADO & WERNECK, 2006) nenhum trabalho foi encontrado referindo especificamente os efeitos da desnutrição sobre o fuso neuromuscular.

2. As Unidades Motoras

2.2.1 Características estruturais:

A unidade motora (UM) é definida como o axônio do motoneurônio (originado no corno anterior da medula espinhal) e todas as fibras musculares por ele inervadas (Figura 5) (LIDDELL & SHERRINGTON, 1925). A função básica da UM é de transformar a sinapse recebida pelo motoneurônio em uma resposta mecânica pelo músculo (HECKMAN & ENOKA, 2003). Assim, a menor contração natural do músculo, corresponde à ativação de uma única unidade motora. Embora uma fibra muscular seja inervada por um único motoneurônio, cada motoneurônio inerva mais de uma fibra muscular (FEINTEIN *et al.*, 1955).

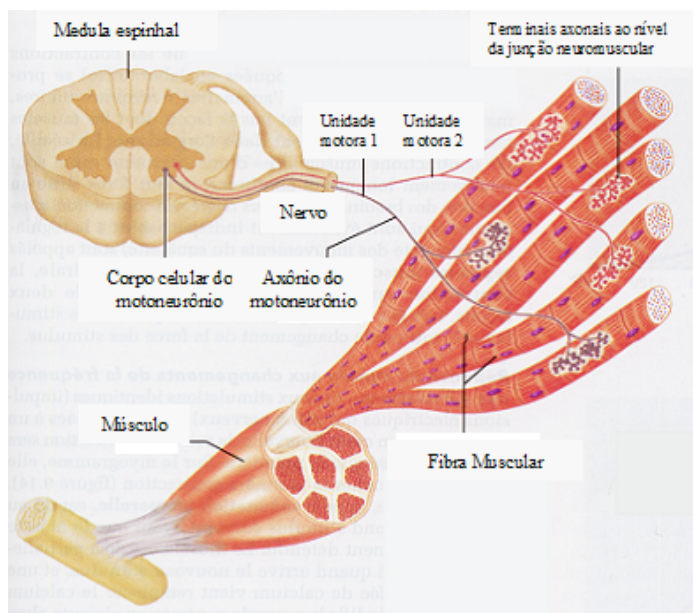


Figura 5. Unidades motoras. Cada unidade motora consiste de um motoneurônio e todas as fibras musculares por ele inervadas. Representação esquemática de duas unidades motoras. Os corpos celulares dos motoneurônios localizam-se na medula espinhal, e seus axônios se estendem até a medula. No interior do músculo, cada axônio se ramifica em um certo número de terminações axonais, que se juntam as fibras musculares disseminadas no músculo (Marieb, 2005).

Dependendo das suas propriedades histoquímicas e mecânicas, as unidades motoras podem ser classificadas em três grupos (BURKE *et al.*, 1971; 1999): as UMs de contração lenta (*Slow-S*), que são muito resistentes a fadiga e possuem fibras do tipo I; as UMs de contração rápida e resistentes à fadiga (*Fast fatigue resistant - FR*) que apresentam fibras do tipo IIa e, finalmente, as UMs de contração rápidas e pouco resistentes à fadiga (*Fast*

fatigable - FF) que apresentam fibras do tipo IIb (Figura 2). Esta classificação é observada tanto em animais (BURKE *et al.*, 1971), quanto em humanos (GARNETT *et al.*, 1979).

Existe uma relação entre as propriedades das fibras musculares e as características eletrofisiológicas dos motoneurônios α que as inervam (BURKE & EDGERTON, 1975). A densidade de aferentes Ia sobre o motoneurônio α é maior nas unidades motoras S, comparadas às unidades motoras FR e FF respectivamente (BURKE & EDGERTON, 1975). A amplitude do potencial pós-sináptico excitatório é maior nas unidades motoras S, quando comparado às unidades FR e FF respectivamente (BURKE & EDGERTON, 1975). Há um aumento progressivo no diâmetro do axônio do motoneurônio α e das fibras musculares por ele inervadas, nas unidades motoras S, FR e FF, respectivamente (BURKE & EDGERTON, 1975). Finalmente, as unidades motoras FF apresentam abalo mecânico rápido e baixa resistência à fadiga, enquanto as unidades FR possuem abalo mecânico com tempo intermediário e são resistentes à fadiga, e as unidades S têm um tempo de abalo maior e são resistentes à fadiga (Figura 6) (BURKE & EDGERTON, 1975). A composição do músculo em tipos de unidades motoras depende das características funcionais do músculo analisado. Músculos ricos em fibras lentas têm função estática na manutenção da postura, enquanto os ricos em fibras rápidas participam de movimentos dinâmicos (COOPER & ECCLES, 1930; EDGERTON *et al.*, 1975).

2.2.2 Recrutamento das unidades motoras.

A força produzida pelo músculo durante uma contração voluntária depende do número de unidades motoras recrutadas e da frequência em que essas unidades disparam potenciais de ação (THOMAS *et al.*, 1991; MACELFIELD *et al.*, 1996). Este recrutamento ocorre no

plano espacial, pelo aumento crescente do número de unidades motoras requisitadas e no plano temporal, na medida em que cresce a frequência de disparos pelos motoneurônios.

De acordo com o “Princípio do Tamanho”, inicialmente os motoneurônios menores são recrutados e posteriormente os maiores, na medida em que a força de contração aumenta (HENNEMAN & OLSON, 1965).

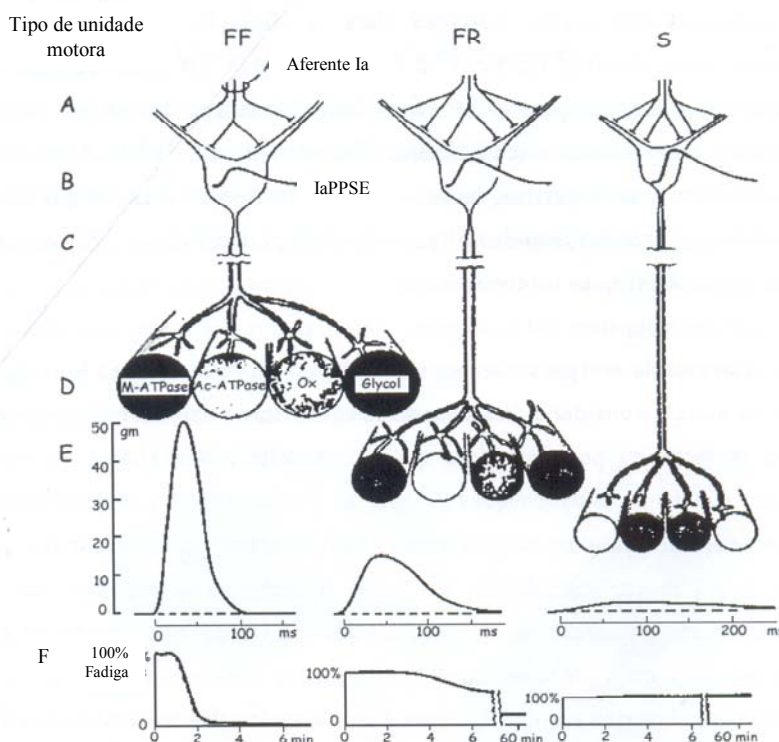


Figura 6. Esquema resumido das características funcionais das unidades motoras lentas e rápidas. A : densidade dos aferentes Ia sobre o motoneurônio; B: amplitude do potencial pos-sináptico excitatório induzido por neurônios de tamanho diferentes; C: diferença no diâmetro dos axônios; D: diferença no diâmetro das células musculares inervadas; E abalo mecânico; F: resistência a fadiga. FF: rápidas e pouco resistentes a fadiga (Fast fatigable); FR: rápidas e resistentes a fadiga (Fast Fatigue Resistant); S: lentas (Slow). Segundo Burke & Edgerton, 1975.

A influência do tamanho sobre a ordem de recrutamento é explicada pela lei Ohm's, que se baseia no argumento de que a mudança no potencial da membrana em resposta à corrente sináptica é proporcional à resistência de entrada do motoneurônio. Assim, como os motoneurônios menores têm uma alta resistência de entrada, eles são despolarizados com

mais facilidade, sendo os primeiros a serem recrutados (HENNEMAN & OLSON, 1965). Por outro lado, os motoneurônios maiores apresentam uma resistência de entrada menor e necessitam de um impulso maior para o seu recrutamento. Como consequência desta relação, as unidades motoras menores tendem a ser ativadas antes das unidades motoras maiores (HENNEMAN & OLSON, 1965). A ordem de recrutamento durante o reflexo de estiramento segue o “Princípio do tamanho” (CALANCIE & BAWA, 1984).

Entretanto, o tamanho do neurônio não é o único determinante da ordem de recrutamento. O tipo de unidade motora, se lenta ou rápida, é também importante, em associação com as propriedades elétricas dos motoneurônios e as propriedades mecânicas das fibras musculares das UMs (FLESHMAN *et al.*, 1981). Porém, a ordem de recrutamento das UMs é diferente em decorrência da natureza involuntária da ativação do músculo com uma estimulação (ERLANGER & GASSER, 1937), onde a ativação do músculo é realizada sem estimular diretamente os terminais nervosos. A resistência de entrada dos axônios maiores, que inervam as fibras rápidas, é menor do que as dos axônios menores, que inervam as fibras lentas (ERLANGER & GASSER, 1937). Assim, as unidades motoras maiores são recrutadas antes das unidades motoras menores (HENNEMAN & MENDEL, 1981), situação inversa daquela observada durante uma contração voluntária, de acordo com o “Princípio do Tamanho” proposto por Henneman & Olson (1965). Trabalhando com humanos, Garnett & Spephens (1981) observaram que a estimulação elétrica de receptores cutâneos, induz por via reflexa a ativação dos motoneurônios maiores e, portanto, das UM maiores.

Explicações sobre os elementos determinantes do “Princípio do Tamanho” podem ser encontradas nos artigos de revisão de Paillard *et al.* (2005) ou de Duchateau *et al.* (2006). O efeito sobre o desenvolvimento da força pelo recrutamento de várias unidades motoras e de sua frequência de disparos pode ser observado na figura 7.

Portanto, o recrutamento temporal corresponde ao aumento da frequência de disparos do motoneurônio a fim de promover um aumento da tensão de uma mesma UM. A frequência de disparos depende de diferentes fatores: o músculo analisado, as modalidades de contração e o nível de contração. Durante uma contração lenta em rampa, as unidades motoras recrutadas disparam primeiramente a uma frequência de descarga base e, durante o aumento da força, a frequência de disparos aumenta até atingir o máximo (Figura 8).

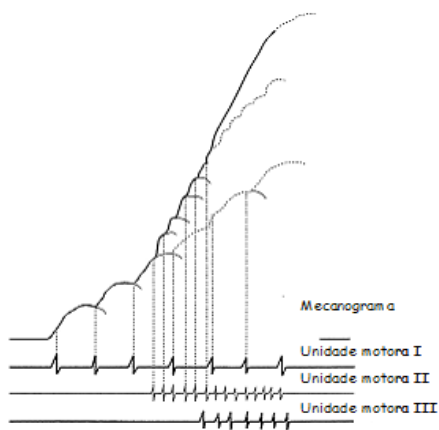


Figure 7: Somação da atividade de 3 unidades motoras por ativação sucessiva em função do nível de força requisitado (Doutreloux, 1998).

Frequência de disparos

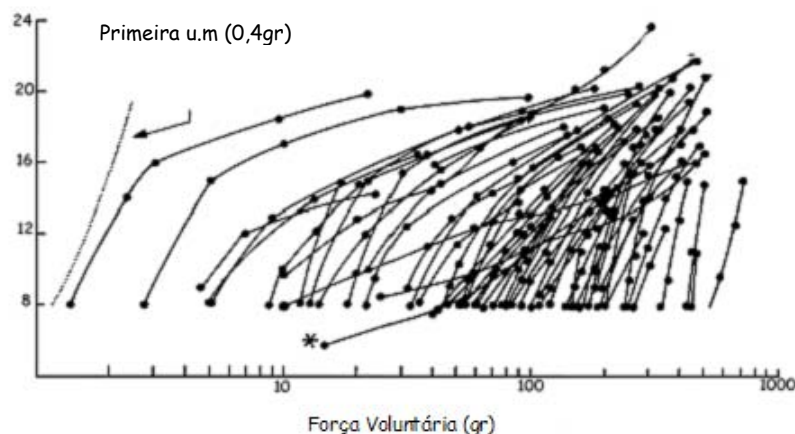


Figure 8: Frequência de disparos de unidades motoras dos extensores dos dedos registrados no momento de uma contração isométrica voluntária. A maior parte das unidades motoras têm uma frequência de disparos ao nível dos 8Hz. A frequência de disparos aumenta até 16-24Hz em função do aumento da força e da relação força-frequência de disparos é mais elevado para as unidades motoras com alto nível. u. m : unidade motora (Monster & Chan, 1977).

Embora a taxa de disparos do motoneurônio de potenciais de ação aumente linearmente com a corrente de despolarização recebida (KERNELL, 1965; SCHWINDT, 1973), existe uma relação sigmóide entre a taxa de disparos a força muscular (ERIM *et al.*, 1996; MORITZ *et al.*, 2005). A taxa mínima, na qual a maioria dos motoneurônios disparam potenciais de ação repetitivamente durante uma contração voluntária, é em torno de 8 pulsos por segundo (pps) (VAN CUTSEM *et al.*, 1997), mas as taxas máximas de disparos varia de acordo com os músculos. As taxas médias de 30 – 50 pps têm sido relatadas para a maioria dos músculos durante contrações isométricas (ENOKA & FUGLENAND, 2001), enquanto taxas de aproximadamente 10 pps tem sido observadas para o músculo solear, de contração lenta (BELLEMARE, 1983). As frequências de disparos instantâneos durante uma contração rápida, contudo, pode chegar aos valores de 100 – 200 pps (DESMEDT & GODAUX, 1977; VAN CUSTSEM & DUCHATEAU, 2005).

2.2.3 Desenvolvimento da inervação muscular

Durante o período embrionário, o processo de inervação do músculo esquelético leva à formação da junção neuromuscular (WITZEMANN, 2006), num processo de interação coordenada e seqüencial, entre o nervo e o músculo (SANES & LICHTMAN, 2001). Cada fibra muscular neonatal apresenta um sítio sináptico, oriundo de uma pré-padronização dos receptores do neurotransmissor acetilcolina, que é freqüentemente contatado por vários e diferentes nervos (WITZEMANN, 2006). Durante o desenvolvimento pós-natal, mudanças nas características funcionais e estruturais da placa motora são observadas. No início da neuro-ontogênese, as fibras musculares são innervadas por vários axônios, um processo chamado de inervação polineuronal e que foi demonstrado em ratos (BALICE-GORDON & THOMPSON, 1988; BENNETT *et al.*, 1986). Com o desenvolvimento pós-natal, a inervação polineuronal é substituída por uma inervação mononeuronal (BALICE-GORDON &

THOMPSON, 1988). O percentual de fibras musculares que recebem mais do que uma sinapse de entrada, reduz rapidamente durante a segunda semana após o nascimento (BROWN *et al.*, 1976). A duração dessa regressão é diferente de acordo com o músculo analisado: no músculo solear do rato, se inicia em torno do 10º dia perdurando até o 16º dia de vida pós-natal (BROWN *et al.*, 1976) (Figura 9). O mecanismo envolvido com a eliminação da inervação polineuronal é provalmente ligado ao aumento geral na atividade dos animais aliada à demanda funcional do músculo (REDFERN, 1970).

Durante as primeiras semanas de vida, quando o animal se torna gradativamente mais ativo, ocorre o aumento da atividade motoneuronal e um conseqüente aumento na liberação da acetilcolina na placa motora (O'BRIEN *et al.*, 1978). A acetilcolina, por sua vez, induz a liberação de enzimas proteolíticas, que efetuam a eliminação de alguns terminais neuronais (O'BRIEN *et al.*, 1978).

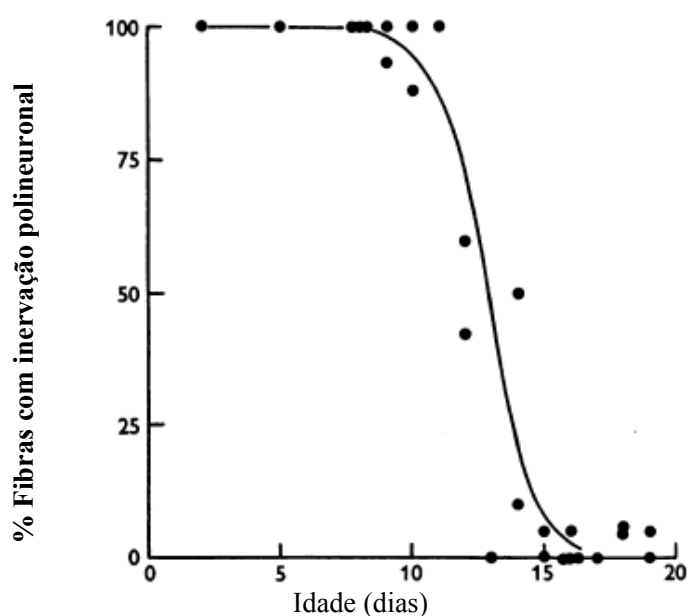


Figura 9. Percentual de fibras do músculo solear do rato inervadas por mais de um axônio em diferentes idades: regressão da inervação polineuronal, determinada por registros intracelular em músculos curarizados (BROWN *et al.*, 1976).

Embora o músculo solear seja um músculo lento e, portanto, diferente do ponto de vista da composição de suas fibras e na sua propriedade de contração, em relação aos

músculos rápidos (BURKE, 1981). O trabalho de Balice-Gordon & Thompson (1988) indica que o processo de eliminação de sinapses nos músculos obedece a um esquema básico, documentado a partir do músculo solear. A eliminação da inervação polineuronal não produz alteração substancial do número dos motoneurônios ou das fibras musculares, havendo apenas uma redução do número de fibras musculares inervadas por cada neurônio (BALICE-GORDON & THOMPSON 1988). Ao nascimento, os tipos de fibras musculares não podem ser distinguidos com base nas suas propriedades de contração, antes da conclusão da eliminação das sinapses (BALICE-GORDON & THOMPSON 1988). Somente após a maturação do retículo sarcoplasmático, juntamente com a mudança do nível de atividade muscular (DRACHMAN & JOHNSTON, 1973) e de uma maior expressão de diferentes isoformas de miosina (REISER *et al.*, 1985), é que as unidades motoras podem ser identificadas.

2.3 Plasticidade das fibras musculares: possível relação da desnutrição com as propriedades das unidades motoras.

- **Plasticidade das fibras musculares durante a maturação**

As fibras musculares e as UMs podem sofrer mudanças fenotípicas impostas por alterações na demanda funcional (BALDWIN & HADDAD, 2001), como a própria maturação dos músculos (CRAMER & VAN ESSEN; 1995). Durante a maturação pós-natal do músculo, o momento destas mudanças fenotípicas vai depender do músculo analisado (ELDER & KAKULAS, 1993). Nos músculos flexores plantares do homem, a diferenciação dos tipos de fibras já está completa aos 3 anos de vida (ELDER & KAKULAS, 1993) correspondendo ao final do período crítico do desenvolvimento do SN. Em ratos, o processo de diferenciação das fibras que define as propriedades funcionais dos músculos ocorre durante o período neonatal (PUNKT *et al.*, 2004). O refinamento das unidades motoras

parece estar relacionado à especificação neural dos tipos de fibras e à eliminação de sinapses inapropriadas durante o período neonatal (CRAMER & VAN ESSEN, 1995).

- **Plasticidade das fibras musculares e atividade física**

O nível de atividade física pode produzir mudanças nas propriedades de contração das fibras musculares e conseqüentemente das unidades motoras de contração rápida ou de contração lenta (EDSTRÖM & GRIMBY, 1985). O treinamento de salto produziu uma redução no conteúdo de fibras do tipo I em relação as fibras do tipo II, no músculo solear de ratos (POUSSON *et al.*, 1991). Também, foi observadas mudanças semelhantes na composição do tipo de fibras musculares no solear de ratos, após três semanas de exposição a microgravidade simulada (CANON & GOUBEL, 1995; ANDERSON *et al.*, 1999). A atividade dos motoneurônios tem um papel importante na determinação das características das unidades motoras. Por exemplo, Foehring et al. (FOEHRING *et al.*, 1986) observaram no gato, que quando a inervação do músculo gastrocnêmio (músculo heterogêneo: 75% de fibras do tipo rápido e 25% de fibras do tipo lento) foi trocada com a do músculo solear (músculo homogêneo: 100% fibras lentas), 31% das unidades motoras do músculo solear transformaram-se em unidades motoras rápidas e que 52% das unidades motoras no músculo gastrocnêmio tornaram-se lentas. Munso *et al.* (1997) observaram a conversão de unidades motoras rápidas em lentas, após ativação crônica de baixa frequência do músculo gastrocnêmio no gato.

- **Plasticidade das fibras musculares e o envelhecimento**

Ratos idosos também parecem apresentar alterações mecânicas e morfológicas nas propriedades das unidades motoras de seus músculos (EDSTRÖM & LARSSON, 1987; EINSIEDEL & LUFF, 1992; LARSSON 1995). Estes estudos tem demonstrado que

mudanças nas propriedades das unidades motoras com a avanço da idade são produzidas por diversos fatores, como alterações degenerativas do motoneurônio e fibra muscular, os processos de desnervação e de reinervação, e também a diferenciação das fibras musculares. Além disso, tem sido sugerido que o envelhecimento atinge de maneira diferente as unidades motoras lentas em relação às unidades rápidas (SUGIURA & KANDA, 2004). Estudando as propriedades das unidades motoras do músculo gastrocnêmio de ratos da idade de 4 a 36 meses, Sugiura & Kanda (2004) observaram que o número de fibras do tipo I não apresentou variação com o envelhecimento, enquanto as fibras do tipo II apresentaram redução. Estes mesmos autores observaram uma redução na velocidade de condução dos motoneurônios α das unidades motoras rápidas em relação às unidades motoras lentas, com o envelhecimento.

- **Plasticidade das fibras musculares e desnutrição**

Vários trabalhos têm demonstrado que a desnutrição é capaz de afetar os músculos (LEWIS & SIECK, 1992; LANZ *et al.*, 1992; OCKEN & GRUNEWALD, 1988; ALMURSHED & GRUNEWALD, 2000). Durante a desnutrição protéico-energética, a massa muscular é reduzida, o tamanho e a distribuição dos tipos de fibras musculares (DWYER & STICKLAND, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Os principais trabalhos sobre a histoquímica e a morfologia das fibras musculares têm avaliado os impactos da desnutrição durante a gestação e o período de aleitamento. Estes trabalhos tem demonstrado uma redução na área de secção transversa do músculo (BEDI *et al.*, 1982; CAVALIERE *et al.*, 1996; HALTIA *et al.*, 1978; HOWELLS *et al.*, 1978) e um atraso na diferenciação do tipo de fibra muscular, predominante sobre as fibras tipo 2 (CAVALIERE *et al.*, 1996; HALTIA *et al.*, 1978). Ratos com a idade de 24 dias e desnutridos durante o período de aleitamento,

apresentaram no músculo gastrocnêmio uma redução no diâmetro das fibras tipo IIa e IIb, mas o diâmetro das fibras I não foi diferente quando comparado ao grupo controle (SILVADO & WERNECK, 2006). Neste mesmo estudo, o percentual da distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares também foi diferente para o grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle (Figura 10). Estudos têm sugerido que a diferença no conteúdo das fibras de contração lenta, em relação às fibras de contração rápida, pode ocorrer como uma resposta fisiológica para economizar energia frente à desnutrição (CROW & KUSHMERICK, 1982; HENRIKSSON, 1990). Outro trabalho, onde foi induzida desnutrição gestacional, também observou uma atrofia seletiva na fibras do tipo II em relação às fibras do tipo I (OLIVEIRA *et al.*, 1999). A explicação proposta por estes autores é que as fibras do tipo I são originadas a partir dos miotubos primários, que são resistentes às influências ambientais, enquanto que as fibras tipo II teriam grande proporção de fibras musculares provenientes dos miotubos secundários, mais suscetíveis aos agravos nutricionais (WARD & STICKLAND, 1991; DASTUR *et al.*, 1979; GOODMAN *et al.*, 1981).

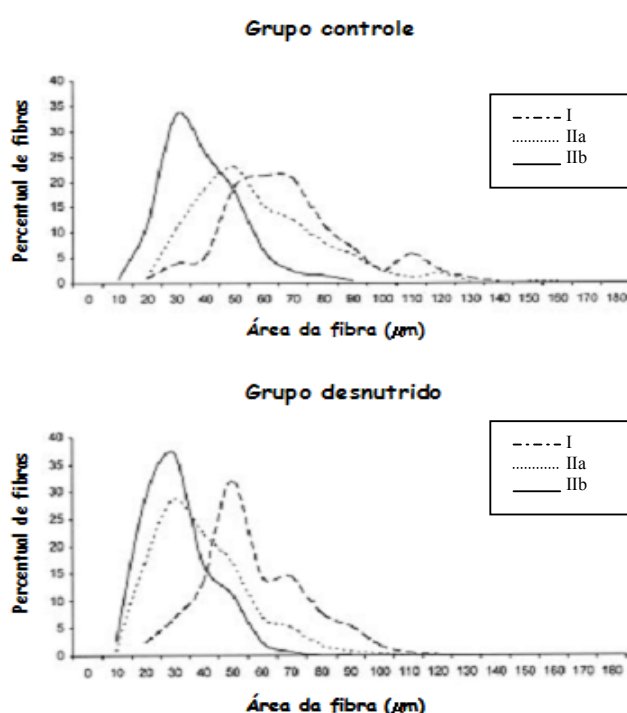


Figura 10. Histograma da distribuição pela área e tipos de fibras do músculo gastrocnêmio de ratos controle e desnutridos durante o período de aleitamento (ATPase pH 4.3) (SILVADO & WERNECK, 2006).

3 - ATIVIDADE REFLEXA – Resposta do músculo ao estiramento.

3.1 Resposta do músculo a uma estimulação elétrica: Reflexo de Hoffmann.

Originalmente descrito por Paul Hoffmann, no início do século 20 (Hoffmann, 1918), foi chamado reflexo de Hoffmann ou reflexo H, em homenagem ao autor da sua primeira descrição (MAGLADERY & MC DOUGAL, 1950). Este reflexo é obtido pela estimulação elétrica de um nervo misto periférico, que contém axônios sensoriais e axônios motores (HOFFMANN, 1918) (Figura 11). É considerado um análogo do reflexo de estiramento, mas que não é influenciado pela atividade do motoneurônio γ sobre o fuso neuromuscular (SCHIEPPATI, 1987). A estimulação elétrica para evocar o reflexo H envolve os aferentes (do ponto de estimulação para medula espinhal) e os eferentes (do motoneurônio α , na medula espinhal, para a junção neuromuscular), como também, a resposta motora direta ou resposta M (do ponto de estimulação no motoneurônio para a junção neuromuscular) (Figura 12). Hoffmann (1918) sugeriu que a primeira resposta a surgir nesta condição é a resposta M obtida pela ativação direta do motoneurônio α , enquanto que a segunda resposta representa o reflexo H, considerado como uma resposta indireta do motoneurônio α , que é recrutado de maneira reflexa através da ativação dos aferentes fusoriais Ia (Figura 12). A natureza precisa do reflexo H foi esclarecida por estudos realizados em animais: ela corresponde principalmente à excitação monossináptica do motoneurônio α pelos aferentes Ia do músculo (MAGLADERY & MC DOUGAL, 1950 ; MAGLADERY *et al.*, 1951; PAILLARD, 1955).

Vários trabalhos de revisão publicados recentemente têm consagrado sua atenção para os principais interesses e limites do estudo do reflexo H (PIERROT-DESEILLIGNY & MAZEVET, 2000; ZEHR, 2002; MISIASZEK, 2003; VOERMAN *et al.*, 2005). Assim, suas principais características serão abordadas nos parágrafos seguintes.

Devido à grande natureza monossináptica do circuito reflexo H, ele tem sido muito utilizado em pesquisas de neurofisiologia clínica. Na verdade, a compreensão simplificada do circuito reflexo H pode conduzir a erros de interpretação sobre a sua real representação da excitabilidade motoneuronal. Tecnicamente, mudanças na amplitude do reflexo H podem ser explicadas em três possibilidades: 1- alterações na excitabilidade dos motoneurônios; 2 – alteração na quantidade de neurotransmissor liberado pelo terminal aferente; ou 3- variação nas propriedades intrínsecas dos motoneurônios. Entretanto, o reflexo H não é um reflexo monossináptico puro originado somente do grupo aferente Ia, mas é confundido pela contribuição de oligosinapses do aferente Ia e outros aferentes de grande diâmetro. Apesar disso, o reflexo H pode e deve ser usado como um instrumento nas pesquisas clínicas ou experimentais, desde que respeitadas as suas limitações.

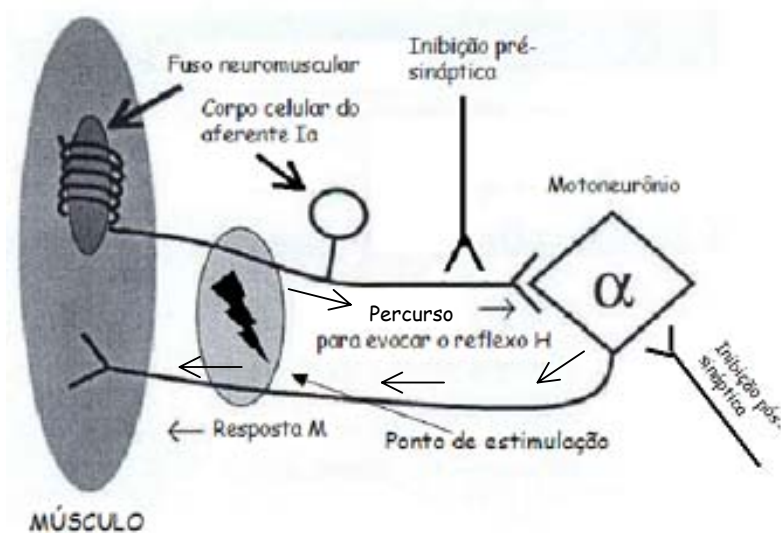


Figura 11. Esquema simplificado dos componentes do reflexo H. O ponto de estimulação elétrica para ativar o nervo periférico é representado pela menor elipse cinza. A ativação do nervo é demonstrada pela propagação ortodrômica no axônio motor para evocar a M onda, e a propagação ortodrômica no axônio sensorial (demonstrando que a comunicação anuloespiral do aferente Ia sobre o fusão neuromuscular) para evocar o reflexo H via conexão monossináptica com o motoneurônio α (Adaptado de Zehr, 2002)

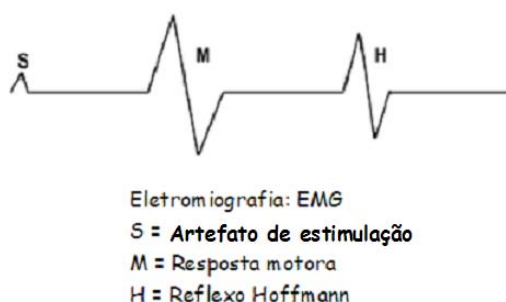


Figura 12. Eletromiografia (EMG) do Artefato de estimulação, Resposta motora e Reflexo Hoffmann.

3.1.1 Curva de recrutamento da resposta M e do reflexo H

Quando um axônio é estimulado eletricamente, de forma experimental, o potencial de ação gerado no ponto de estimulação se propaga nos dois sentidos do axônio (condução ortodrômica e condução antidrômica). Na direção ortodrômica, que corresponde ao sentido do aferente Ia para o motoneurônio α e na direção antidrômica que corresponde ao sentido contrário. Aumentando progressivamente a intensidade da estimulação elétrica sobre o axônio, é possível obter a curva de recrutamento das respostas H e M, pela relação entre a intensidade do estímulo e a amplitude das respostas registradas (Figura 13). Assim, os primeiros motoneurônios a serem recrutados são os de menor limiar de excitabilidade, aqueles de maior diâmetro (aferente Ia), aparecendo a reflexo H. Com o aumento progressivo da intensidade de estimulação, os neurônios de maior limiar de excitabilidade e menor diâmetro (motoneurônio α) começam a ser recrutados, aparecendo a resposta M. A condução antidrômica gerada sobre o motoneurônio α colide com o potencial de ação ortodrômico gerado sobre o aferente Ia, determinando o seu bloqueio progressivo. Assim, o aumento da intensidade de estimulação eleva a amplitude da resposta M e reduz a amplitude da resposta H (PIERROT-DESEILLIGNY & MAZEVET, 2000).

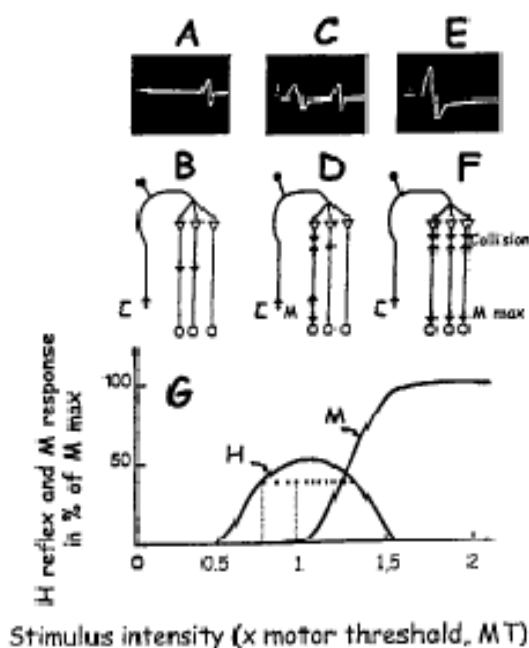


Figura 13. (G) Curva de recrutamento no músculo solear das respostas H e M. A - F corresponde à representação esquemática dos acontecimentos relativos ao aumento da intensidade da estimulação e ao surgimento das respostas H e M máximas (Pierrot-Deseilligny & Mazevet, 2000).

O reflexo H é usualmente expresso em parâmetros de latência e amplitude. A latência corresponde ao tempo necessário entre a estimulação elétrica e o primeiro registro do sinal. Ela representa a soma do tempo de condução do impulso aferente e eferente, mais o tempo de transmissão sináptica na medula espinhal. A amplitude é calculada pela diferença em mV entre o pico positivo e negativo do sinal EMG (Figura 14).

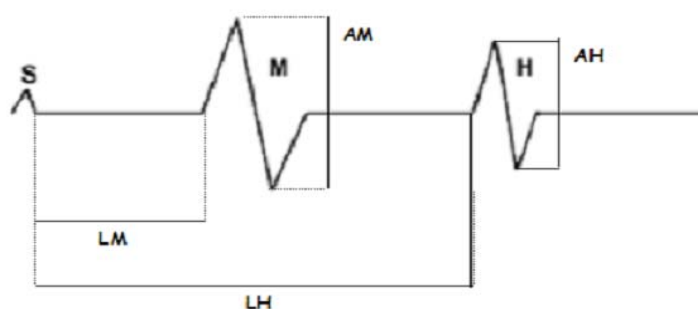


Figura 14. Parâmetros avaliados no reflexo H e resposta M.

Respostas H e M: Parâmetros amplitude e latência.

S: Artefato de estimulação

M: resposta motora

LM: latência do M

AM: Amplitude do M

H: reflexo Hoffmann

LH: latência do H

AH: Amplitude do H

3.1.2 Resposta motora máxima (Mmax) e sua variabilidade.

Uma estimulação de forte intensidade sobre o nervo misto produz a resposta M, que corresponde à ativação direta dos motoneurônios α (HOFFMANN, 1918; MAGLADERY & MC DOUGAL, 1950; PIERROT-DESEILLIGNY & MAZEVET, 2000; TURKER, *et al.*, 2005). No músculo solear humano, a resposta M apresenta um tempo de latência de aproximadamente 7 ms (KUDINA & ALEXEEVA, 1992). No rato, a latência média da resposta motora é em torno de 1 ms (PÉROT & ALMEIDA-SILVEIRA, 1994). A resposta motora máxima (Mmax) é obtida com o aumento da intensidade de estimulação até o ponto onde a amplitude da resposta M não se altera, o que corresponde à ativação total do músculo (HUGON, 1973; HWANG, 2002). Esta resposta é frequentemente utilizada como fator de normalização do reflexo H, que é expresso em fração da resposta Mmax (H/Mmax) (TUCKER & TÜRKER, 2004; PIERROT-DESEILLIGNY & MAZEVET, 2000; ZEHR, 2002). Tem sido demonstrado que a magnitude da resposta Mmax do músculo pode mudar consideravelmente quando o membro é colocado em diferentes posições (SIMONSE & DYHRE-POULSEN, 1999; SIMONSE *et al.*, 1995) ou durante diferentes níveis de contração muscular (TURKER & TÜRKER, 2004). Esta variação é atribuída à alteração do ângulo das fibras musculares (GERILOVSKY *et al.*, 1989), ou mudanças na efetividade da estimulação (FUMOTO *et al.*, 2002; SIMONSE & DYHRE-POULSEN, 1999). A magnitude da resposta Mmax também pode reduzir significativamente com o prolongamento da experimentação e o aparecimento do cansaço pelo sujeito (CRONE *et al.*, 1999). Além disso, o horário da experimentação (CASTAINGTS *et al.*, 2004), a temperatura do músculo (DEWHURST *et al.*, 2005), o acúmulo de fluido intersticial no membro testado (CASTAINGTS *et al.*, 2004)

e a redução da eficiência da bomba de sódio e potássio, que pode ocorrer com a repetida ativação das unidades motoras (NIELSEN & CLAUSEN, 2000), podem afetar a resposta M.

3.1.3 Reflexo Hoffmann (Hmax) e sua variabilidade.

A descrição dos resultados do estudo do reflexo H deve ser muito cuidadosa devido à significativa influência pré-sináptica e pós-sináptica sobre a alça reflexa. A magnitude do reflexo H é conhecida por ser modulada a partir de fatores centrais e periféricos (MISIASZEK, 2003).

- **Inibição Pré-sináptica.**

Frank & Fuortes (1957) descreveram uma depressão dos potenciais monossinápticos pós-sinápticos excitatórios (EPSPs) Ia, que ocorreu sem qualquer mudança na condutividade e no potencial de membrana do motoneurônio. Esta inibição pré-sináptica (PSI), que é acompanhada pela despolarização do aferente primário (DAP), é causada por sinapses gabaérgicas axo-axonais (para revisão ver RUDOMIN, 1990), transmitidas pelos interneurônios relacionados com a DAP. No gato, este processo resulta na depressão do reflexo monossináptico por várias centenas de ms e pode ser muito drástica (ECCLES *et al.*, 1962). No Homem, mudanças altamente significativas na inibição pré-sináptica dos terminais Ia tem sido observadas durante movimentos voluntários (HULTBORN *et al.*, 1987) e após estimulação cortical (MEUNIER & PIERROT-DESEILLIGNY, 1989). Mudança na inibição pré-sináptica do terminal Ia, bem como na excitabilidade do motoneurônio, podem produzir alterações na amplitude do reflexo monossináptico. Significante modulação inibitória da amplitude do reflexo H solear ocorre com a mudança postural: deitado, sentado ou em pé (GOULART *et al.*, 2000; ZEHR, 2006). O esquema da figura 15 representa os efeitos da mudança postural sobre a inibição do reflexo H. A amplitude do reflexo H é maior quando o

indivíduo está deitado e reduz progressivamente na medida em o indivíduo fica em pé, caminha ou corre, o que corresponde ao aumento gradual da inibição pré-sináptica.

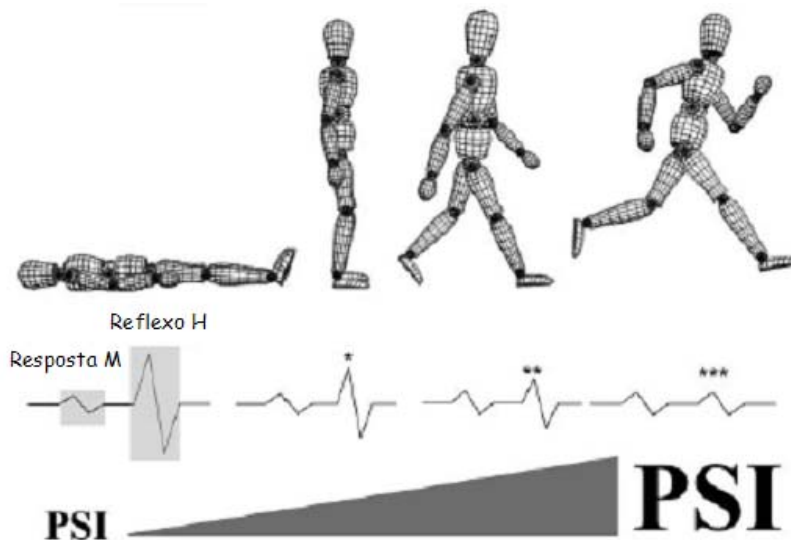


Figura 15. Efeito da inibição pré-sináptica (PSI) sobre o padrão do reflexo H solear. Mudanças no PSI do aferente Ia produzem alterações na amplitude do reflexo H e dependem da atividade motora. A figura acima apresenta a performance em 4 posições diferentes com a correspondente redução na amplitude média do reflexo H e o aumento no PSI (asteriscos correspondem a atividade inibitória dos interneurônios no aferente Ia). Observe que a intensidade do estímulo é mantida constante e resposta M permanece constante a cada mudança da posição corporal (Zehr et al., 2006).

O aumento na amplitude do reflexo H, observado quando o indivíduos encontra-se na posição deitado, é atribuído a uma redução da inibição pré-sináptica. Duchateau (1995), ao testar o reflexo H de indivíduos mantidos na posição deitado, sugeriu que o aumento observado na amplitude do reflexo H, deve-se a uma remoção parcial do fenômeno pré-sináptico inibitório, que produz um aumento da eficácia sináptica sobre o motoneurônio. Lambert et al. (2003) também atribuiu ao aumento da eficácia sináptica, pela redução da inibição pré-sináptica, a possível explicação para a maior excitabilidade reflexa observada em cosmonautas após longo período no espaço, ou seja, em hipoatividade.

Além disso, a influência da inibição pré-sináptica sobre o reflexo H pode ser confirmada através de trabalhos que comparam a amplitude do reflexo H de indivíduos jovens ou idosos em diferentes posições (EARLES *et al.*, 2001; TSURUIKE *et al.*, 2003). Tsuruike et al. (2003) estudaram a amplitude do reflexo H de indivíduos jovens e adultos, na posição deitada

ou na posição em pé. Os indivíduos jovens demonstraram uma diferença significativa na amplitude do reflexo H, entre as posições deitado ou em pé, enquanto os indivíduos idosos não apresentaram a mesma diferença. Estes dados indicam que com o envelhecimento parece haver uma redução da influência pré-sináptica inibitória em relação à condição postural (Figura 16).

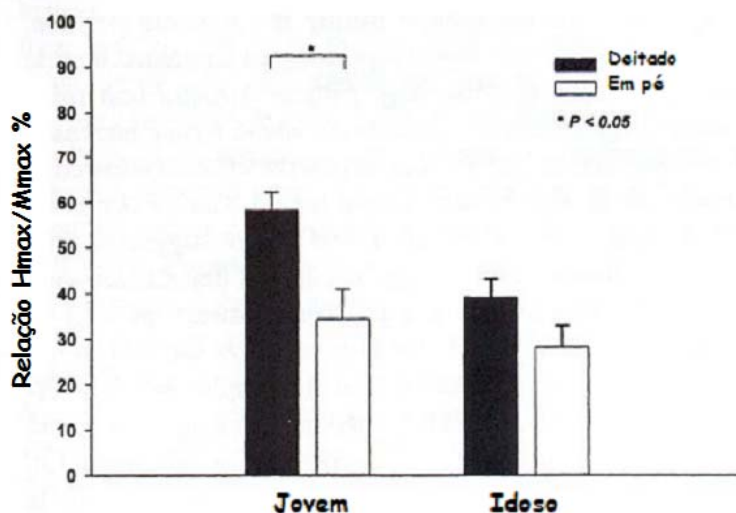


Figura 16. Redução do reflexo H em diferentes posições: deitados e em pé, expresso pela relação H_{max}/M_{max} de indivíduos jovens e idosos. O reflexo H diminui na posição em pé nos indivíduos jovens, e não ocorre diferença nos indivíduos idosos (Tsuruike et al., 2003).

- **Depressão Pós-ativação**

Outro mecanismo inibitório pré-sináptico é a depressão pós-ativação, que consiste na redução da quantidade de neurotransmissor liberado pelo aferente Ia, que foi previamente ativado, no terminal pré-sináptico (HULTBORN *et al.*, 1996; PIERROT-DESEILLIGNY & MAZEVET, 2000). O efeito da depressão pós-ativação com conseqüente redução da amplitude do reflexo H persiste por aproximadamente 8s (MAGLADERY & McDOUGAL, 1950). A depressão pós-ativação é um fator importante ligado a alterações na amplitude do reflexo H, e particularmente durante o movimento. A mudança do comprimento do músculo durante o movimento, ativa o fuso neuromuscular que resulta na ativação dos aferentes Ia,

que também são requisitados durante o reflexo H (HULTBORN *et al.*, 1996). Assim, a ativação do aferente Ia pode estar ligada a supressão do reflexo H (HULTBORN *et al.*, 1996). Deve-se lembrar que a ativação do aferente Ia pode produzir algum efeito refratário pela estimulação elétrica do nervo, reduzindo a transmissão do arco reflexo H pelo menor recrutamento do aferente Ia (BURKED, 2002)

- **Excitabilidade do motoneurônio**

Como discutido anteriormente (ver 2. As Unidades Motoras), os motoneurônios menores são mais excitáveis e inervam as fibras do tipo I (HENNEMAN & OLSON, 1965). Como o músculo solear é rico em fibras tipo I, ele apresenta uma excitabilidade reflexa bastante elevada, sendo muito estudado sobretudo em condição de repouso. Assim, alterações no reflexo H possivelmente demonstram adaptações das unidades motoras, que podem ser produzidas por mudanças nas propriedades intrínsecas dos motoneurônios.

Não existem dúvidas que a excitabilidade do motoneurônio tem um papel substancial na determinação da amplitude do reflexo H. Com a convergência de eventos pós-sinápticos excitatórios e inibitórios, o nível de despolarização dos motoneurônios pode reduzir ou aumentar, produzindo alterações na amplitude do reflexo H (MISIASZEK, 2003). Variações na amplitude do reflexo H podem ocorrer por variações nas propriedades intrínsecas dos motoneurônios. O músculo solear de indivíduos submetidos ao treinamento de resistência demonstrou um aumento no reflexo H (GINET *et al.*, 1975) em relação a indivíduos sedentários. Contrariamente, programas de treinamento de força produzem uma redução no reflexo H solear (CASABONA *et al.*, 1990; NIELSEN *et al.*, 1993). Estudos têm sugerido que a excitabilidade motoneuronal pode ser alterada pelo treinamento em resistência: alterações no reflexo H podem ser vistas quando comparados os reflexos obtidos antes e após o período de treinamento (PÉROT *et al.*, 1991). Contudo, outro trabalho demonstrou que a

eletroestimulação dos músculos solear e gastrocnêmio, durante 4 semanas de treinamento, não promoveu alteração significativa no reflexo H (MAFFIULETTI *et al.*, 2003), indicando que a eletroestimulação não afeta a excitabilidade do motoneurônio. Além disso, mudanças de curto prazo também podem modificar as propriedades do motoneurônio. Por exemplo, o neurotransmissor 5-hydroxytryptamina (5-HT ou serotonina) é capaz de modificar as propriedades de disparos do motoneurônios (LEE *et al.*, 2007). Existem muitas evidências de que esta substância contribui para geração de potenciais platô nos motoneurônios, alterando as propriedades de disparos dos motoneurônios (LEE *et al.*, 2007). A implicação é que estas mudanças impostas pelo treinamento em longo prazo ou pela modulação de neurotransmissores a curto prazo podem alterar as propriedades dos motoneurônios afetando sua capacidade de ganho de recrutamento para o reflexo H.

3.1.4 Reflexo H em modelos animais: adaptações.

A eletrofisiologia é uma excelente ferramenta para a investigação não invasiva da função axonal. Modelos experimentais tem sido bastante empregados nos estudos das neuropatias periféricas, no nervo ciático em ratos (DE KONING, 1987; SHARMA & THOMAS, 1974; VAN MEETEREN, 1997). Algumas publicações têm se focalizado sobre a relação da idade com a velocidade de condução motora. Stanley (1980) estudou a latência e a velocidade de condução dos nervos sensoriais e motores com o reflexo H, usando ratos com peso corporal variando entre 100 – 600g, e idade variando entre 1 - 18 meses. Neste trabalho, foi observado uma redução da latência do reflexo H, e também um aumento da velocidade de condução com o crescimento do rato. Em ratos híbridos, a velocidade de condução motora e a latência do reflexo H foram analisadas no nervo tibial aos 6, 18, 30 e 32 meses (WINEINGER *et al.*, 1995). Foi observado que não havia diferença significativa da velocidade de condução entre a idade de 32 meses e as idades de 6 e 18 meses. Mais

recentemente, Hort-Legrand et al. (2001) estudaram a velocidade de condução sensorial, a velocidade de condução motora e a amplitude do potencial sensorial (reflexo H) de ratos normais, entre as idades de 1 – 23 meses. Os resultados deste trabalho revelaram haver um rápido aumento dos parâmetros de velocidade de condução e amplitude entre o 1º mês e o 5º mês, seguido de uma estabilização entre 6º mês e o 13º mês e, por fim, uma diminuição destes parâmetros a partir do 14º mês (HORT-LEGRAND, 2001). A figura 17 apresenta a regressão linear da amplitude do potencial sensorial em relação ao aumento da idade em ratos, obtida no estudo de Hort-Legrand (2001).

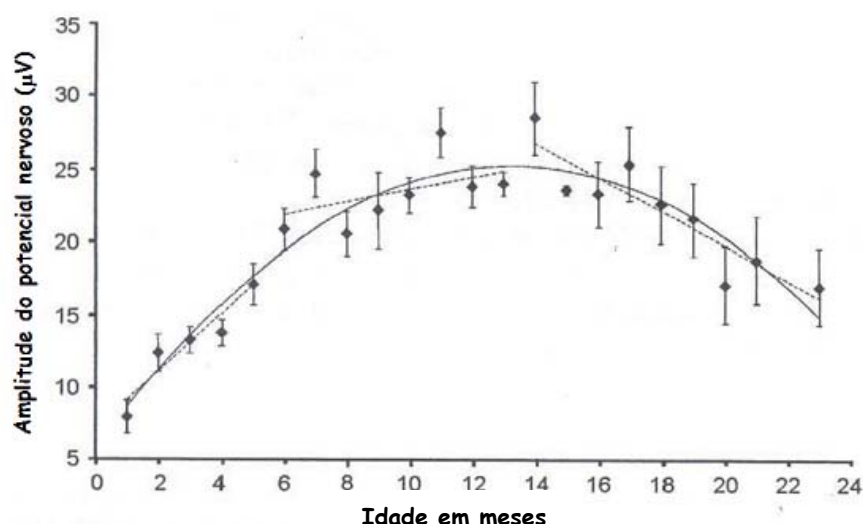


Figura 17. Regressão linear da amplitude do potencial sensorial pelo aumento da idade em ratos. Os dados correspondem a uma parábola que representa os diferentes estágios da evolução da amplitude do potencial sensorial (HORT-LEGRAND, 2001).

Novos métodos para evocar o reflexo H (ou análogos) têm sido documentados, tanto em humanos (ERTEKIN *et al.*, 1996; MACCABEE *et al.*, 1996; PEASE *et al.*, 1997) como em animais (PÉROT & ALMEIDA-SILVEIRA, 1994; GOZARIU *et al.*, 1998; DE-DONCKER *et al.*, 2006).

Em seu trabalho, Pérot & Almeida-Silveira (1994) descreveram com sucesso a transposição da metodologia reflexa aplicada em humanos para o rato, permitindo a utilização de um método não invasivo e sem o emprego de anestésicos nos animais para o

estudo reflexo H. Mais recentemente, De-Doncker et al. (2006) obtiveram o registro neurográfico de um análogo do reflexo H induzido pela estimulação elétrica do nervo solear, ao nível da vértebra L₅.

O uso de modelos animais em estudos da excitabilidade reflexa também permite avaliar as adaptações do reflexo H em decorrência de alterações na demanda funcional. Têm sido descritas adaptações a longo prazo na magnitude do reflexo H em modelos animais, induzidas pelo treinamento (WOLPAW, 1997; WOLPAW & TENNISSEN, 2001). Ratos submetidos a treinamento de contração rápida apresentaram uma redução no reflexo H (ALMEIDA-SILVEIRA *et al.*, 1996). Um resultado oposto, onde foi observado um aumento da amplitude reflexa e um aumento relativo das fibras tipo I, foi observado em ratos treinados em corrida (PÉROT & ALMEIDA-SILVEIRA, 1995). Assim, mudanças na demanda funcional do músculo induzidas pelo exercício produzem adaptações da excitabilidade reflexa.

A suspensão dos membros posteriores (microgravidade simulada) em ratos é muito utilizada como um modelo de desuso. Este modelo é conhecido por perturbar as propriedades mecânicas dos músculos posturais. Após suspensão dos membros posteriores (SMP), o músculo solear, de contração lenta, apresenta um aumento na velocidade de contração (DIFEE *et al.*, 1991; FITTS *et al.*, 1986), bem como uma redução na elasticidade (CANON & GOUBEL, 1995), havendo uma redução na proporção de fibras do tipo I e relação as fibras do tipo II (DESPLANCHES *et al.*, 1987). Com base nestes achados, a hipótese de Anderson et al. (1999) em seu trabalho, foi de que haveria uma redução no reflexo H de ratos Sprague-Dawley após três semanas de SMP. Contudo, os seus resultados revelaram um aumento na amplitude do reflexo H após a SMP, indicando que a hipoatividade induzida pelo SMP provavelmente deve aumentar a eficiência sináptica entre as fibras Ia e o motoneurônio α .

Em outro estudo, após 14 de SMP foi observada uma redução no análogo neurográfico do reflexo H em ratos Wistar (DE-DONCKER *et al.*, 2006).

3.2 Resposta do músculo a uma estimulação mecânica: Reflexo Tendinoso.

A estimulação mecânica do tendão produz o reflexo tendinoso ou reflexo T. A deformação produzida pela percussão do tendão se propaga pelo músculo e estimula os aferentes Ia, no fuso neuromuscular, gerando um impulso nervoso que percorre os neurônios sensoriais, até a medula espinhal onde atinge os motoneurônios α , que conduzem o impulso até o músculo produzindo uma contração curta (Figura 18). O eletromiograma permite detectar esta resposta tendinosa de curta duração e curta latência que no músculo solear do homem é de aproximadamente 30 a 35 ms (PAILLARD, 1955) e no músculo solear do rato é de aproximadamente 8 a 10 ms (PÉROT & ALMEIDA-SILVEIRA, 1994). O reflexo T, portanto, representa a ativação da alça reflexa monossináptica Ia- α (PAILLARD, 1955). Tradicionalmente, o reflexo T é considerado como monossináptico embora oligossínapses possam interferir no seu surgimento, como citado anteriormente (ver reflexo H). Os principais parâmetros avaliados com o reflexo T são a latência e a amplitude. A latência corresponde ao tempo entre a percussão do tendão e o surgimento do sinal eletromiográfico. Na experimentação com animais, o momento exato do contato do martelo com a pele do animal pode ser obtido com o auxílio de um captor de força para registrar o mecanograma. A amplitude é calculada pela diferença pico a pico entre o pólo negativo e o pólo positivo no sinal EMG (Figura 19). Vários tendões nos membros superiores e inferiores são adequados para evocar o reflexo T em indivíduos saudáveis.

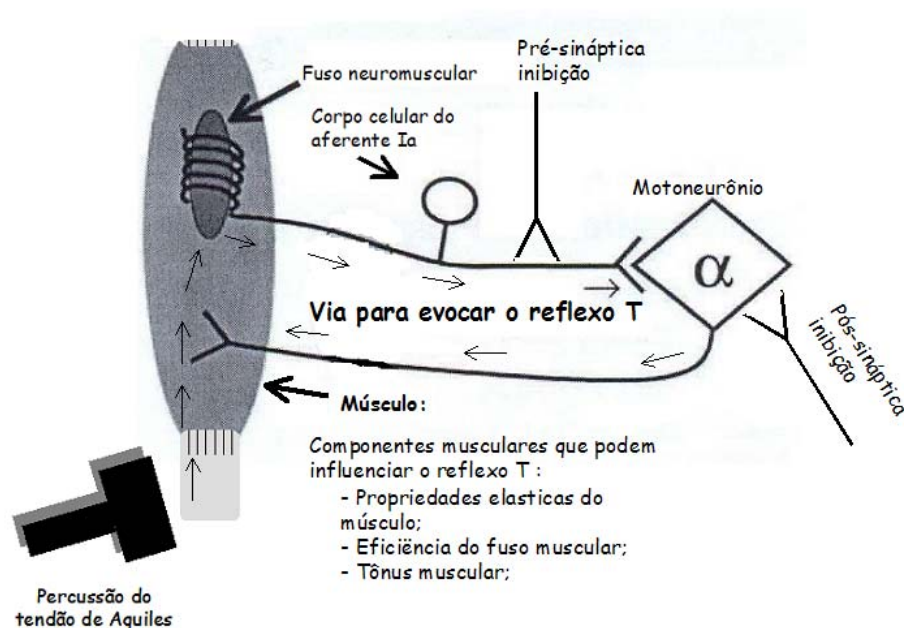


Figura 18. Esquema simplificado dos componentes do reflexo T. Percussão do tendão para ativar o aferente Ia é representada pelo martelo. A ativação do aferente Ia é demonstrada pela propagação ortodrômica no axônio sensorial (demonstrando a comunicação anuloespiral do aferente Ia sobre o fuso neuromuscular) e a conexão monossináptica com o motoneurônio α para evocar o reflexo T (Adaptado de Zehr, 2002).

Contudo, em geral o reflexo T é evocado nos membros inferiores especificamente no joelho (reflexo Patelar) e no tornozelo (reflexo de Aquiles). Nos membros superiores a obtenção do reflexo T é usualmente mais difícil, mas a percussão do tendão pode ser realizada sobre o tendão do supinador, do pronador, do bíceps, do tríceps, dos flexores dos dedos e do maxilar (para revisão ver VOERMAN *et al.*, 2005).

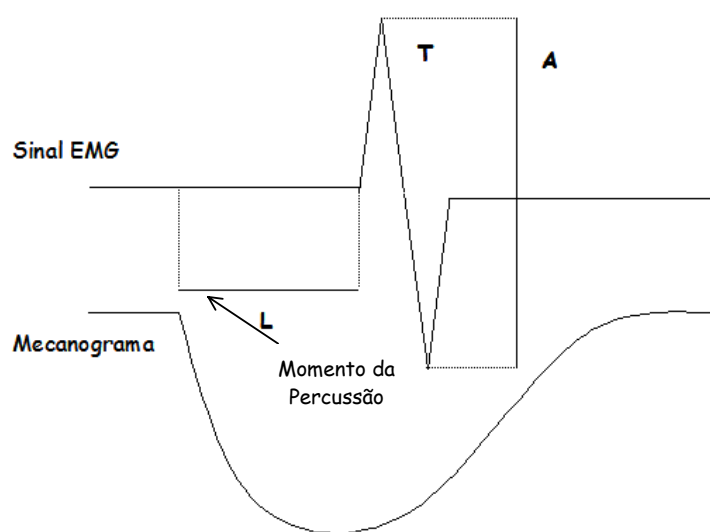


Figura 19. Sinal EMG do reflexo T. Principais parâmetros avaliados, com **L** representando a latência e **A** representando a amplitude do reflexo T respectivamente. Mecanograma apresentando o momento exato da percussão do tendão.

O significado clínico do reflexo T (especialmente: o Patelar e o de Aquiles) é principalmente o de determinar o grau de funcionalidade do arco reflexo (KURUOGLU & OH, 1993), e avaliar o sistema motor (TOFT, 1995), sendo utilizado como uma ferramenta para avaliação de alterações neurológicas e neuromusculares (UYSAL *et al.*, 1999; KAWASAKI *et al.*, 2004). Experimentalmente, o reflexo T pode ser utilizado para avaliar as repercussões de diferentes demandas funcionais como: o treinamento físico em diferentes modalidades esportivas (MAFFIULETTI *et al.*, 2003; ALMEIDA-SILVEIRA *et al.*, 1996), a maturação e o envelhecimento (KAMEN & KOCEJA, 1989; PÉREON *et al.*, 2004; GROSSET *et al.*, 2007) e do desuso (ANDERSON *et al.*, 1999; LAMBERTZ *et al.*, 2003), sobre a excitabilidade reflexa.

3. 2. 1 Variabilidade do reflexo T

Na literatura o reflexo T e o reflexo H são usualmente empregados como métodos capazes de identificar o padrão de excitabilidade do motoneurônio α . Assim, os processos

discutidos anteriormente sobre a variabilidade do reflexo H também se aplicam ao reflexo T (ver reflexo H e sua variabilidade). Contudo, o reflexo T envolve diferentes parâmetros com a participação do músculo como: as propriedades visco-elásticas das estruturas músculo-tendinosas e articulares (RACK *et al.*, 1983, 1985), a eficiência do fuso neuromuscular (PAILLARD, 1955) e o próprio tônus muscular (AL-FALAHE & VALLBO, 1988; RIBOT-CISAR *et al.*, 2000).

A influência das propriedades visco-elásticas das estruturas músculo-tendinosas e articulares foram bem estudadas por Joyce et al. (1974) e também, por Rack et al. (1983; 1984; 1985). Como resultado destes trabalhos, atualmente é proposto que a perturbação mecânica pode ser transmitida integralmente ou não ao fuso neuromuscular, que por sua vez pode responder de maneira mais ou menos importante. A elasticidade relativa do tendão em relação às fibras musculares determina a taxa de perturbação detectada pelos fusos neuromusculares. Tendões maiores, mais flexíveis e menos rígidos, transmitem menos a deformação às fibras musculares e fusoriais, enquanto os tendões menores, menos flexíveis e mais rígidos, transmitem quase que integralmente a deformação.

A eficiência do fuso neuromuscular é preservada pela ativação dos neurônios fusomotores quem tornam o fuso neuromuscular mais sensível ao estiramento em qualquer que seja a condição de contração (HULLIGER *et al.*, 1977a, 1977b; MATTHEWS, 1981). Alterações no funcionamento do sistema fusomotor podem interferir na eficiência do fuso neuromuscular. A variabilidade da resposta ao estiramento pode também ser modificada pelo nível de vigilância do indivíduo, que influencia o tônus fusomotor e o nível de descargas tônicas dos aferentes Ia (AL-FALAHE & VALLBO, 1988; RIBOT-CISAR *et al.*, 2000). O que em ratos pode ser induzido pelo nível de estresse ao qual o animal é submetido durante a experimentação.

São raros os dados na literatura concernentes a avaliação da maturação do reflexo T no homem e no rato do período neonatal até a idade adulta. No homem, alguns trabalhos são dedicados a comparar as latências do reflexo T, de crianças lactantes e indivíduos adultos, por diferentes grupos musculares, como o tríceps e o bíceps braquial (MC DONOUGH *et al.*, 2001) ou o músculo solear (PEREON *et al.*, 2004). Estes trabalhos indicam um aumento da latência com a idade associada a um aumento da velocidade de condução pela maturação dos processos de mielinização. Mais recentemente Grosset *et al.* (2007) também observaram que existe uma relação diretamente proporcional entre a latência do reflexo T e o aumento da idade em crianças pré-adolescentes (Figura 20).

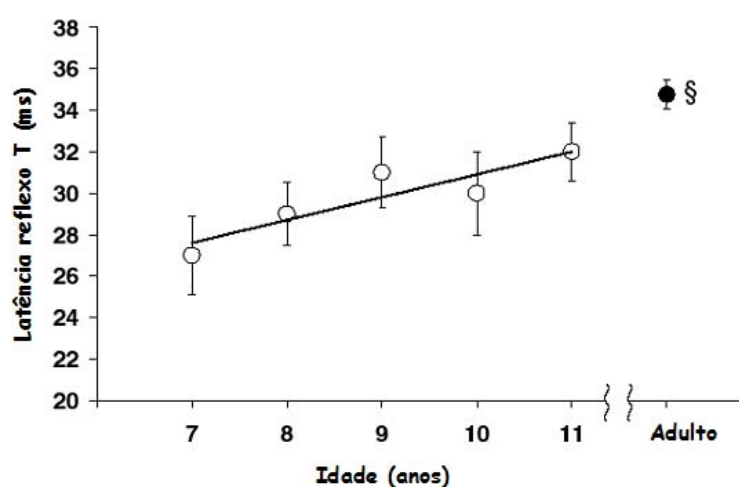


Figura 20. Relação entre a latência do reflexo T no tríceps sural e a idade de pré-adolescentes. A latência do reflexo T foi significativamente correlacionada com a idade de pré-adolescentes (O) ($r = 0.97$, $n = 5$; $p < 0.05$) e foram menores que no adulto (●). Dados estão em média $\pm$ SE. (§) representa diferença significativa entre o valores do adulto e os valores dos pré-adolescentes ANOVA ($p < 0.05$) (Segundo GROSSET *et al.*, 2007).

Neste mesmo trabalho foi observado que a amplitude do reflexo T também aumenta com o aumento da idade nos pré-adolescentes. No músculo solear houve um aumento de $15,6 \pm 1,8\%$ aos 7 anos para $20,3 \pm 3,7\%$ aos 11 anos de idade, e no músculo tríceps sural o aumento foi de $7,5 \pm 1,5\%$ aos 7 anos para $13,4 \pm 1,8\%$ aos 11 anos de idade. Entretanto, os valores permaneceram inferiores aos do adulto de $28,0 \pm 4,3\%$ no solear e

$18,3 \pm 2,4\%$ no tríceps sural (Figura 21). Estes dados são importantes, pois fornecem informações sobre o reflexo T em uma janela temporal até então ainda não estudada.

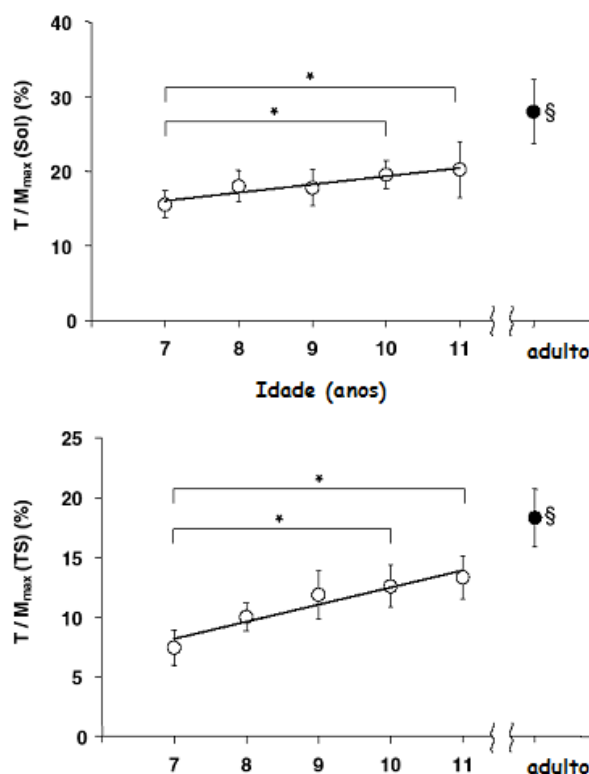


Figura 21. Relação T/Mmax e a idade de pré-adolescentes nos músculos solear (A) e tríceps sural (B). A relação T/Max foi correlacionada significativamente com a idade dos pré-adolescentes (o) (A: $r = 0.94$, $n = 5$; $p < 0.05$; B: $r = 0.96$, $n = 5$; $P < 0.05$). A relação T/Mmax dos músculos solear e tríceps sural de todas as crianças foram menores que nos adultos (●). Dados são expressos em médias $\pm$ SE. (*) representa diferença significativa entre os pré-adolescentes e (§) representa diferença significativa entre os adultos e todos os pré-adolescentes ANOVA ($p < 0.05$) (GROSSET et al., 2007).

Na experimentação com ratos, o nosso levantamento bibliográfico não encontrou nenhum trabalho referindo a maturação do reflexo T, possivelmente dada à dificuldade de padronização da técnica em animais de pequeno porte. Os dois únicos trabalhos que nós encontramos referindo o estudo do reflexo T em ratos foram conduzidos pela equipe de

pesquisa do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade de Tecnologia de Compiègne – Fr. O primeiro trabalho publicado por Pérot & Almeida-Silveira (1994), descreve uma técnica inovadora para transposição do método utilizado para obtenção do reflexo T no homem para o rato. E no segundo trabalho, publicado por Anderson et al. (1999), foi observado que animais submetidos durante 9 semanas à microgravidade simulada pela técnica de SMP, apresentaram redução no reflexo T, o que foi atribuído a possíveis mudanças nos componentes periféricos do reflexo de estiramento como por exemplo o fuso neuromuscular.

3.3 Efeitos da desnutrição sobre a excitabilidade reflexa do músculo.

Segundo encontramos em nosso levantamento bibliográfico, vários trabalhos tem demonstrado que a desnutrição é capaz de alterar a velocidade de condução nervosa tanto em crianças (SINGH *et al.*, 1976; GHOSH *et al.*, 1979) quanto em animais (SEGURA *et al.*, 2001; 2004; DA-SILVA *et al.*, 1987). Nos trabalhos desenvolvidos por Segura et al. (2001, 2004), foi demonstrado que deficiências nutricionais durante o período perinatal resultam em redução na velocidade de condução e na amplitude do potencial de ação evocado em nervos sensoriais de ratos. Estes achados são atribuídos a uma alteração no desenvolvimento pós-natal da bainha de mielina em axônios de animais desnutridos. Outro estudo (DA-SILVA *et al.*, 1987) demonstrou que há redução na velocidade de condução do impulso nervoso em ratos adultos submetidos à desnutrição crônica. Neste trabalho, os resultados encontrados são atribuídos à quantidade da dieta e a qualidade ou a quantidade do conteúdo protéico presente na dieta. Contudo, quando a desnutrição é imposta na idade adulta, ela não parece interferir na velocidade de condução do impulso nervoso (DA-SILVA *et al.*, 1987). Uma boa revisão sobre as consequências neurológicas da desnutrição em humanos e animais pode ser encontrada no trabalho de Chopra (1991). Carências específicas em vitaminas do complexo B

também interferem na condução somatossensorial em ratos (CLAUS *et al.*, 1984; ZEGERS DE BEYL *et al.*, 1988). Além disso, alterações estruturais e metabólicas podem ocorrer nos músculos na presença da desnutrição (BEDI *et al.*, 1982; ARDAWI *et al.*, 1989; SILVADO *et al.*, 2006; WARD & STICKLAND, 1991; ALMURSHED & GRUNEWALD, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Embora mudanças na excitabilidade reflexa possam ocorrer por alterações das propriedades intrínsecas dos motoneurônios ou das propriedades elásticas dos músculos, curiosamente, nenhum trabalho foi encontrado referindo os efeitos da desnutrição sobre a excitabilidade reflexa, pela medida do reflexo de Hofmann ou do reflexo Tendinoso em ratos.

II. A ATIVIDADE LOCOMOTORA

1- Desenvolvimento da atividade locomotora.

Os comportamentos locomotores estão estreitamente relacionados à sobrevivência dos mamíferos e requerem uma coordenação fina e precisa da atividade simultânea das diversas vias motoras. A atividade integrativa do SN torna possível as ações que envolvem o comportamento proposicional, e depende de uma hierarquia entre os sistemas motores. As habilidades funcionais vão se aperfeiçoando à medida que se estende o processo de desenvolvimento, com as mudanças complexas e interligadas que acompanham o crescimento e maturação dos sistemas orgânicos (PURVES, 1994, MASSION, 1998). Assim, a ocorrência de distúrbios na forma de doenças, limitações à livre movimentação ou restrições nutricionais podem afetar negativamente o processo de desenvolvimento. A avaliação da ontogênese motora é uma ferramenta bastante utilizada no diagnóstico de

disfunções relacionadas a alterações do desenvolvimento neuromuscular e psicomotor no início da vida (BARROS *et al.*, 2006; EICKMAN *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar que os eventos relacionados ao desenvolvimento motor seguem uma sequência pré-determinada e característica em cada espécie. Em ratos e camundongos, foi igualmente verificada uma sequência ontogenética para o desenvolvimento motor (FOX, 1965; SMART & DOBBING, 1971, GRAMSBERGEN, 1998). Observa-se um período inicial de movimentação reflexa, fortemente voltada para atividades envolvendo a conservação da temperatura corporal e a obtenção do alimento. A seguir, outro período é marcado pela inibição dos reflexos primitivos e a obtenção de um controle aparentemente mais voluntário (FOX, 1965). Ao final da segunda semana de vida, os padrões de movimento e locomoção tornam-se mais semelhantes aos do animal adulto. Ao desmame, o rato apresenta um repertório completo de movimentos semelhante ao do rato adulto, embora este repertório ainda evolua durante a fase de crescimento e maturação sexual, no sentido de refinamento na coordenação (WALTON *et al.*, 1992).

Na primeira semana de vida, a principal atividade locomotora no rato consiste num rastejar ineficiente no deslocamento do corpo contra a gravidade, suficiente apenas para guiar o animal, a partir de estímulos olfatórios, na busca do mamilo materno para se alimentar, e se manter em contato com a ninhada buscando equilíbrio térmico (JAMON & CLARAC, 1998). A maturação vestibular será crucial para a evolução motora, tendo sido demonstrado que este desenvolvimento se dará de forma importante entre o oitavo dia de vida embrionária até o 15º dia pós-natal (CLARAC *et al.*, 2004).

Gramsbergen (1998) resumiu os achados mais freqüentes relacionados ao desenvolvimento motor no rato. No 16º dia de vida embrionária, é possível observar as primeiras movimentações de tronco e membros, e movimentos com certa coordenação entre

as patas pode ser visto no 20º dia embrionário. Se o rato for colocado na água, podem ser vistos movimentos rítmicos com as patas, semelhantes aos de natação, no 1º dia de vida pós-natal. No 4º ou 5º dia, movimentos nas quatro patas produzem um rastejar sem grande sucesso para deslocamento, mas que leva ao pivoteamento do corpo do animal, e influencia movimentos laterais de tronco. Ao 8º dia, graças ao maior controle postural e coordenação de grupos, conforme demonstrado por EMG, o rato consegue sustentar-se sobre as quatro patas, podendo realizar alguns passos. Concordando com citações anteriores, observa-se ao final da segunda semana, no 15-16º dias pós-natais, um melhor padrão de marcha, com maior abdução de patas posteriores oferecendo melhor base de sustentação e maior velocidade. No EMG, identifica-se nesta fase a expressão de um padrão recíproco de ativação de grupos musculares flexores e extensores nas patas.

O EMG permite observar também a evolução da associação de movimentos de tronco e patas no desenvolver da marcha em ratos. No 15º dia pós-natal, há ativação dos músculos extensores do tronco, relacionada com o ciclo de apoio e balanço na marcha. Esta atividade se mostra como consequência da estabilidade postural necessária à marcha, que caracteriza o início do padrão adulto de locomoção. O padrão de recrutamento dos extensores de tronco atingido no 21º dia pós-natal, idade de desmame no rato, não difere do adulto, o que confirma a hipótese de que o período do aleitamento, que corresponde às três primeiras semanas de vida no rato, pode ser considerado um período crítico para o desenvolvimento da locomoção (WALTON *et al.*, 1992; GRAMSBERGEN, 1998).

É interessante observar que estudos experimentais demonstram que os padrões de locomoção em desenvolvimento no rato são influenciáveis pela experiência sensório-motora: animais que sofreram restrições à locomoção livre nesta idade precoce, a segunda semana pós-natal, tiveram alterações permanentes no padrão de movimentação das patas posteriores

(WALTON *et al.*, 1992). Essa correlação entre período de intensa maturação estrutural e funcional remete ao conceito de período crítico para o desenvolvimento, conforme descrito para o SN (MORGANE *et al.*, 1978), estendendo este conceito também ao sistema muscular (WALTON *et al.*, 1992).

O adequado desempenho das funções motoras, assim, envolve a integração e o desenvolvimento normal de diversos sistemas orgânicos. Além do papel fundamental do SN na coordenação e controle da ação motora, o sistema muscular assume papel de destaque por sua função de geração da força mecânica que vai permitir o deslocamento de segmentos e do corpo como um todo.

2. Efeitos da desnutrição sobre a atividade locomotora.

A redução da atividade locomotora tem sido comumente associada à diminuição da interação social (SALAS *et al.*, 1998), ou a alterações no comportamento emocional de ratos neonatos (SMART & DOBBING, 1971). Estes últimos autores, observaram um aumento de movimentos de rotação em ratos desnutridos, que seria um fator que influencia negativamente o padrão de desenvolvimento do movimento organizado. Nagy *et al.* (1977) apresentaram os resultados similares, associando esta "agitação comportamental" a uma falta da inibição do comportamento locomotor. Ratos desnutridos podem apresentar uma redução do crescimento cerebelar e mudanças no padrão de movimentação (LYNCH *et al.*, 1975).

Mais recentemente Barros *et al.* (2006), puderam observar que animais submetidos à desnutrição, durante o período de aleitamento, apresentaram uma redução na atividade locomotora (Tabela 1). Embora os animais desnutridos tenham demonstrado uma evolução na atividade locomotora ao longo do período neonatal, os valores, em termos de números de quadrados invadidos no *open-field*, foram inferiores aos dos animais controles com 21 dias de

vida (BARROS e col, 2006). Estes autores também observaram um atraso no crescimento somático e na maturação de reflexos, dos animais desnutridos, alterações capazes de prejudicar as experiências do movimento.

Grupos	Idade (dias)		
	D7	D14	D21
Controle	1.06 ± 0.15	13.24 ± 1.14 *	54.68 ± 2.80 *
Desnutrido	1.13 ± 0.15	8.49 ± 0.68 *	44.54 ± 3.08 *#

Tabela 1. Evolução da atividade locomotora de ratos controle e desnutridos aos 7, 14 e 21 dias de vida. valores em média ± dp, * significa diferença intragrupos nas idades distintas e # significa diferença entre os grupos, revelando efeito do tipo de nutrição (p < 0,05) (barros et al; 2006).

Em humanos, o histórico da ocorrência de desnutrição precoce também pode estar relacionado ao atraso no desenvolvimento psíquico e motor em crianças. Por exemplo, nos relatos de Ivanovic et al. (1996) e Benefice et al. (1999), que correlacionaram baixos escores escolares a sinais de desnutrição pregressa, e redução na coordenação motora em crianças desnutridas, respectivamente. Assim, a desnutrição precoce no humano também é capaz de influenciar negativamente o desenvolvimento infantil (BENITEZ-BRIBIESCA, 1999; GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 1987; DREWETT *et al.*, 2001, LAURENTINO *et al.*, 2006), como por exemplo na evolução de comportamentos motores (BHATIA *et al.*, 1979; BENEFICE *et al.*, 1999).

III. CONSIDERAÇÕES RELEVANTES SOBRE A DESNUTRIÇÃO

1- Desnutrição neonatal e suplementação de dietas

Entre os fatores exógenos passíveis de influenciar o desenvolvimento, a nutrição ocupa papel de destaque. Um suprimento adequado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento em todos os sistemas orgânicos, assim como para o desenvolvimento de suas respectivas funções (MORGANE, 1993; PESSOA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003). Por exemplo, durante esse desenvolvimento do sistema nervoso foram identificados “períodos críticos”, nos quais este sistema está mais vulnerável a agressões (MORGANE *et al.*, 1978). O primeiro período crítico se refere à multiplicação e organização iniciais de neuroblastos que, nos mamíferos, acontece no período pré-natal (MORGANE *et al.*, 1993). O segundo é aquele correspondente ao crescimento rápido do cérebro, com migração e diferenciação neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização evidentes (DOBBING, 1964; MORGANE *et al.*, 1978). No rato, todo o segundo período crítico é pós-natal durante a fase de aleitamento (WINICK & NOBLE, 1966). No homem, esse período inicia-se no terceiro trimestre do desenvolvimento intra-uterino, continuando-se por dois a quatro anos após o nascimento (MORGANE *et al.*, 1978). Ao longo das décadas, a teoria do período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso, vem sendo cada vez mais ampliada e atualmente pode ser aplicada para todos os sistemas orgânicos. Em virtude de, no rato os primeiros 21 dias de vida pós-natal corresponderem ao segundo período crítico de desenvolvimento, muitos trabalhos experimentais têm utilizado este modelo animal para o estudo do desenvolvimento.

Portanto, a desnutrição neonatal é capaz de alterar o padrão dos eventos morfogenéticos que ocorrem nesta fase, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e aquisição de padrões fisiológicos maduros no organismo (RESNICK *et al.*, 1979; NOBACK & EISENMAN, 1981). Neste particular, alguns trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade da UFPE, tem

recentemente trazido mais esclarecimentos sobre os impactos da desnutrição neonatal ao desenvolvimento e funcionamento do organismo. Barreto-Medeiros *et al.* (2004) observaram que animais desnutridos durante o período neonatal apresentavam alterações nos padrões de respostas comportamentais agressivas e alimentares, quando atingiam a idade adulta. A desnutrição neonatal também reduziu os neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente em ratos adultos (MARINHO *et al.*, 2004). Alterações no crescimento somático são também produzidas pela desnutrição neonatal, tendo sido proposto um protocolo para medida de indicadores do desenvolvimento somático em ratos (SILVA e col., 2006). Estes estudos certamente servem de base para a elaboração de estratégias de prevenção e combate a desnutrição. Como, por exemplo, a elaboração de suplementos alimentares para atender a demanda nutricional em populações carentes.

Técnicas de enriquecimento de alimentos são utilizadas em países subdesenvolvidos como o Brasil, na tentativa de combater os efeitos deletérios das carências nutricionais (TEODÓSIO *et al.*, 2000). Alguns estudos têm apresentado bons resultados a partir da suplementação de dietas carentes com macro e micronutrientes (NESTEL *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2003, BEINNER & LAMOUNIER, 2003). Estes trabalhos discutem a biodisponibilidade, bem como a melhor forma de incorporação destes nutrientes aos alimentos (NESTEL *et al.*, 2003). Bons resultados foram obtidos, com a utilização da proteína do soro do leite para suplementar uma dieta carente em cálcio, com o objetivo favorecer o processo de formação do osso em ratos (KELLY *et al.*, 2003). A fortificação de alimentos com ferro também pode ser empregada com bastante sucesso no combate a anemia (BEINNER & LAMOUNIER, 2003). Além disso, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, bem como a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 1991), preconizam a suplementação de alimentos com proteínas de alto valor

biológico para combater a desnutrição em todo mundo. O consumo de aminoácidos essenciais é empregado para promover o incremento do ganho de peso e altura em populações carentes (ALLEN *et al.*, 1991), sabendo-se que as proteínas têm marcante contribuição para o desenvolvimento das estruturas do organismos (SCHRIER & PORATH, 1965; STEWART *et al.*, 1975; MORGANE, 1993).

Além disso, a presença de evidências epidemiológicas de que doenças metabólicas que ocorrem durante a fase adulta, em indivíduos recuperados nutricionalmente, mas que foram desnutridos no início da vida, tornam ainda mais importante o estudo da desnutrição neonatal e da recuperação nutricional.

2 - Hipótese do fenótipo protetor

A associação entre agressões no período crítico do desenvolvimento e repercussões tardias surgiram a partir do modelo da influência fenotípica, segundo o qual o organismo se adaptaria favoravelmente a um ambiente hostil durante a fase precoce da vida (HALES & BARKER, 1992). Evidências epidemiológicas indicam que a desnutrição no período fetal e na infância predispõe o indivíduo adulto a uma série de doenças, como a diabetes tipo II e hipertensão (FORSDAHL, 1977; RAVELLI *et al.*, 1998). A desnutrição pode atuar no período crítico do desenvolvimento como estímulo ambiental para desenvolver uma “programação”, que terá efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos (LUCAS *et al.*, 1999). No estudo acima, foi observado que o organismo se adapta à desnutrição perinatal, programando o metabolismo da insulina (HALES & BARKER, 1992). Esta adaptação tende a aumentar a capacidade do organismo para um provável ambiente agressivo subsequente (BARKER, 1998). Propondo uma programação do padrão metabólico do organismo, a partir de agressões nutricionais em períodos

sensíveis e críticos do desenvolvimento, esta hipótese fornece elementos para entender a origem de determinadas enfermidades, as quais tomaram proporções epidemiológicas (OZANNE & HALES, 1999). Embora essa teoria justifique alterações metabólicas referentes a um determinado mecanismo, a expressão de alterações tardias relacionadas, por exemplo, as alterações estruturais e do equilíbrio de neurotransmissores na idade adulta, em animais que sofreram agressões nutricionais durante o período crítico do desenvolvimento (BLATT *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995), pode expandir esta idéia para outros sistemas orgânicos.

Em tese, a desnutrição poderia, portanto, produzir alterações no sistema neuro-musculo-esquelético, que permitiriam ao organismo maior chance de sobrevivência durante a agressão, mas que poderiam limitar sua capacidade funcional. Entretanto, as evidências sobre a influência desta hipótese fenotípica sobre outros sistemas ainda são escassas. Da mesma forma, são relativamente escassas referências sobre agressões durante o período precoce do desenvolvimento sobre o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema muscular. Nesse sentido, levando 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 nas funções a eles relacionadas, a exemplo das funções neuromusculares.



OBJETIVOS

IV. PROPOSTA DO ESTUDO - OBJETIVOS

GERAL:

Estudar os efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento da excitabilidade reflexa e do controle motor em ratos.

ESPECÍFICOS:

- Analisar, ao desmame, a excitabilidade reflexa dos músculos flexores plantares no período neonatal.
- Avaliar a maturação da excitabilidade reflexa dos músculos flexores plantares aos 21, 40, 60 e 90 dias de idade.
- Examinar o desenvolvimento da atividade locomotora em ratos alimentados com uma dieta suplementada com proteína.



HIPÓTESES

V. HIPÓTESES

- A desnutrição neonatal reduz a excitabilidade reflexa de ratos ao desmame.
- A desnutrição neonatal retarda a maturação da excitabilidade reflexa de ratos durante o desenvolvimento.
- A desnutrição neonatal induz a “programação” no sistema neuromuscular de ratos.
- Os efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento da atividade locomotora em ratos são reduzidos pela suplementação protéica.



CAPÍTULO 2

Artigo: 1 “Malnutrition during brain growth alters the H- and T-reflexes in weaning rats”

Malnutrition during brain growth alters the H- and T-reflexes in weaning rats.

Sebastião Rogério de Freitas Silva^{a*}, Raul Manhães-de-Castro^a, Chantal Pérot^b.

^aDepartamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

^bUMR CNRS 6600, Université de Technologie de Compiègne, 60205 Compiègne, France.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of neonatal malnutrition on the hoffmann reflex (H-reflex) and achilles tendon reflex (T-reflex) of weaning rats. Male Wistar rats (n=18) were divided, during suckling period, into three groups: casein 17% (C17, n=6), casein 8% (C8, n=6) and “regional basic diet” (RBD, n=6), with 7.8% protein. At weaning (21 days) the reflex excitability of the ankle plantarflexors was tested in non-invasive conditions, using surface stimulating and recording electrodes. Electrical stimulations of the sciatic nerve were applied to the wakeful rat to obtain the maximal direct motor response (mmax) or the maximal H- reflex responses (hmax). Percussions of the achilles tendon induced the T-reflex. the five highest responses were averaged to give the mmax, hmax and tmax responses, characterized in peak-to-peak amplitude. The hmax and tmax reflexes were expressed in percentage of mmax. body weight was measured daily from the day of birth to weaning. The body weight gain was lower on the 3rd day ($p<0.05$) in the RBD group and on the 10th day ($p<0.05$) in the C8 when compared to the C17 group. There was no difference in mmax peak-to-peak amplitude among groups. The hmax/mmax ratio was lower in the rbd and C8 groups ($p<0.05$) when compared to the C17 group. the tmax/mmax ratio was lower only in the rbd group ($p<0.05$), when compared to the C17 group. We conclude that neonatal malnutrition affects the reflex excitability measured at weaning period in rats.

Key words: malnutrition; critical development period; neonate rats; reflex maturation; programming

Address correspondence to: Chantal Pérot, UMR CNRS 6600, UTC, BP 20529 – 60205 Compiègne Cedex – France.
Telephone: +33 03 44 23 43 92 – Fax: +33 03 44 20 48 13. e-mail:chantal.perot@utc.fr

INTRODUCTION

Among the exogenous factors able to influence growth and development, nutrition plays an eminent role [1,2]. Acting during the critical development period of the nervous system [1], malnutrition is able to alter the development and the acquisition of normal physiological patterns in the organism [3-5]. During this period, constituent cellular processes occur at high speed and intensity, which makes the nervous system more vulnerable to aggressive stimuli [6-1]. In rats, the critical development period of the nervous system corresponds to the first 21 days of life [1]. Malnutrition may act as a stimulus during development, producing a permanent effect on the definitive structure and on its function in the organism, a mechanism called “programming” [7, 8]. Animals submitted to neonatal malnutrition showed a delayed reflex ontogeny and evolution of locomotion patterns [5]. The consolidation of the movement and locomotion patterns in rats occurs gradually from the third week (end of the neonatal period) to adulthood [9, 10]. It is also known that perinatal malnutrition may affect some aspects of neuromuscular function, particularly sensory action potential conduction [11].

Monosynaptic stretch reflex circuit development starts during embryonic life and extends to postnatal life [12]. In rats, during the neonatal period both a regression of polyneuronal innervations and changes in the properties of motor units occur [13]. However, there is a dearth of studies aimed at analyzing the impact of malnutrition on the reflex excitability. In this study, the non-invasive method for testing reflex excitability in wakeful rats [14] was adapted to measure H- and T- reflexes in very small rats (aged 21 days), whether submitted or not to neonatal malnutrition.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diets

Male Wistar rats (n=18) were used. The animals were kept at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, in a light-dark cycle (lights on from 6 a.m. to 6 p.m.). After mating and confirmation of gestation, the female rats were housed individually in polypropylene cages, with free access to water and a standard diet (Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) containing 18% protein, 5% fat, 57% carbohydrate and 340 Kcal% (see <http://www.teklab.com>). The male neonates were randomly distributed, constituting litters of 6 pups per mother and were breastfed during the first 21 postnatal days (lactation period). The experiment was approved by the Ethical Committee of the Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, and followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals.

The nutritional groups were constituted according to the diet given to the mother during the lactation period: casein 17% (C17, n=6), which received the 17% protein, casein 8% (C8, n=6), which received the 8% protein and the “regional basic diet” (RBD, n=6), which received the 7.8% protein. The detailed constituents of the three diets are given in Table 1. The casein 17% diet was elaborated according to the recommendations of the American Institute of Nutrition [15]. The casein 8% diet was designed to be hypoproteic, but isocaloric. RBD diet has a low protein content (7.8%), a low fat content, and was also deficient in vitamins and some minerals [16].

Weight Evolution

Body weight was measured daily on a digital scale (Sartorius 1264 MP®, 0.01g sensibility), to determine weight evolution in the experimental groups.

Table 1. Centesimal composition of casein 17% (C17), casein 8% (C8) and regional basic diet (RBD) diets.

Diet	Ingredients	g%	Centesimal Composition (g)							Kcal%
			Protein	Carbohydrates	Fats	Ash	Fibres	Vitamins	Minerals	
C17 [§]	Casein (≥ 92,5)	18.38	17.00	--	--	--	--	--	--	68.00
	Maisena	64.57	--	58.11	--	--	--	--	--	232.44
	Soybean oil	7.00	--	--	7.00	--	--	--	--	63.00
	Fibres	5.00	--	--	--	--	5.00	--	--	--
	Mix vit	1.00	--	--	--	--	--	1.00	--	--
	Mix min.	3.50	--	--	--	--	--	--	3.50	--
	Bit. Cholin	0.25	--	--	--	--	--	0.25	--	--
	L-Metionin	0.30	0.30	--	--	--	--	--	--	--
	TOTAL	100.00	17.30	58.11	7.00	--	5.00	1.25	3.50	363.44
C8 [§]	Casein (≥ 92,5)	8.65	8.00	--	--	--	--	--	--	32.00
	Maisena	74.3	--	66.87	--	--	--	--	--	267.48
	Soybean oil	7.00	--	--	7.00	--	--	--	--	63.00
	Fibres	5.00	--	--	--	--	--	--	5.00	--
	Mix. vit	1.00	--	--	--	--	1.00	--	--	--
	Mix. min.	3.50	--	--	--	--	--	3.50	--	--
	Bit. Cholin	0.25	--	--	--	--	0.25	--	--	--
	L-Metionin	0.30	0.30	--	--	--	--	--	--	--
	TOTAL	100.00	8.30	66.87	7.00	--	1.25	3.50	5.00	362.48
RBD*	Beans ^a	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	--	--	60.76
	Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	--	--	198.80
	Dried and salted meat ^a	3.74	2.74	--	0.06	0.06	--	--	--	11.50
	Dried and salted meat fat ^a	0.35	--	--	0.35	--	--	--	--	3.15
	Sweet potato	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	--	--	41.43
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	--	--	315.64

§ AIN -93 based diets, except for the protein content of diet C8.

* Regional basic diet from northeast Brazil [17].

^a Cooked in water and dried.

Procedures in reflex testing

The method of recording the reflexes was noninvasive, and the rats were tested in the wakeful state, without the use of an anaesthetic [14]. The reflexes were elicited in all 21-day-old rats (weaning age), always at the same time of day, in the morning, bearing in mind that a circadian rhythm of the H reflex has been described in the rat [17].

The reflex excitability of the plantar-flexor muscles was evaluated in both hind legs of rats in each experimental group. Following shaving the legs, surface Ag-AgCl electrodes (2 mm in diameter) were positioned in a mid-leg position, in the area overlying the soleus muscle, and kept in position by sticking plaster. The use of surface electrodes for electromyogram (EMG) recordings was preferred to inserted electrodes in order to limit stress and to facilitate keeping the rats in the quiet state required for conducting the reflex testing. Throughout the experiment, the EMG was observed on a control oscilloscope (Tektronix TDS 3014[®]); this allowed the application of the electrical or mechanical stimulus only during rest phases attested by flat EMGs. The reference electrode was a needle pricked in the tail. After fixation of the electrodes, the rat was placed in a recumbent position, in ventral decubitus, on the ergometer platform. The sole of the foot was placed on a plate covered with adhesive tape. Knee and ankle were flexed to about 90°. The experimenters placed a hand on the back of the animal and a finger on the foot. Thus, comfortably maintained in place, the rat accepted the stimuli, almost always without trying to escape.

M wave and H-reflex

The stimulating electrodes (two rigid and cranked copper electrodes, 0,8 mm wide and 2 mm apart) were positioned along the sciatic nerve, parallel to the femur and held in position by the experimenter. The electrical stimulations were 0.2 ms in duration and around 2 - 10 mA in intensity. The intensity of stimulations was gradually increased to obtain either the maximal H response or the maximal M wave on the oscilloscope. Around thirty electrical stimuli were applied with at least 3 seconds' rest after each stimulus.

T-Reflex

The mechanical stimulations were applied on the Achilles tendon by means of an electromagnetic hammer adapted to the size of the animal. The tendon tap was adjusted in intensity to be painless and its intensity was constant for all animals. The hammer was positioned 1 mm from the tendon. When switched on, it moved forward about 2 mm, striking the tendon for about 20 ms. At least 20 tendon taps were imposed.

The total duration of the experiment for one rat (both legs) did not exceed 30 minutes, including the rest and nursing periods between the tests.

Data acquisition and treatment.

The electromyographic data were sent to an acquisition software program, Data Translation (DT9800), and digitized at a sample frequency of 10 kHz. Individual M-, H- or T- responses were quantified in peak-to- peak amplitudes and the five highest responses of each type were then averaged to give the Mmax, Hmax and Tmax responses. Hmax or Tmax responses were expressed in percent of Mmax. For each group of rats, results were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare mean values of the three groups of rats; the ANOVA was

followed by Fisher's least significant difference test (LSD). The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

The body weight increased regularly for the three groups of rats until the 21st day of life but, compared with the C17 group, the increase was lower as early as the 3rd day ($p < 0.05$) for the RBD group and the 10th day ($p < 0.05$) for the C8 group (Figure 1).

Table 2 summarizes the electromyographical data recorded for the three groups. there was no significant difference in the peak-to-peak amplitude in mmax between the groups; the hmax/mmax ratio was lower in the rbd and c8 groups ($p < 0.05$) in comparison with the c17 group, whilst the tmax/mmax ratio was lower only in the rbd group ($p < 0.05$) when compared with the c17.

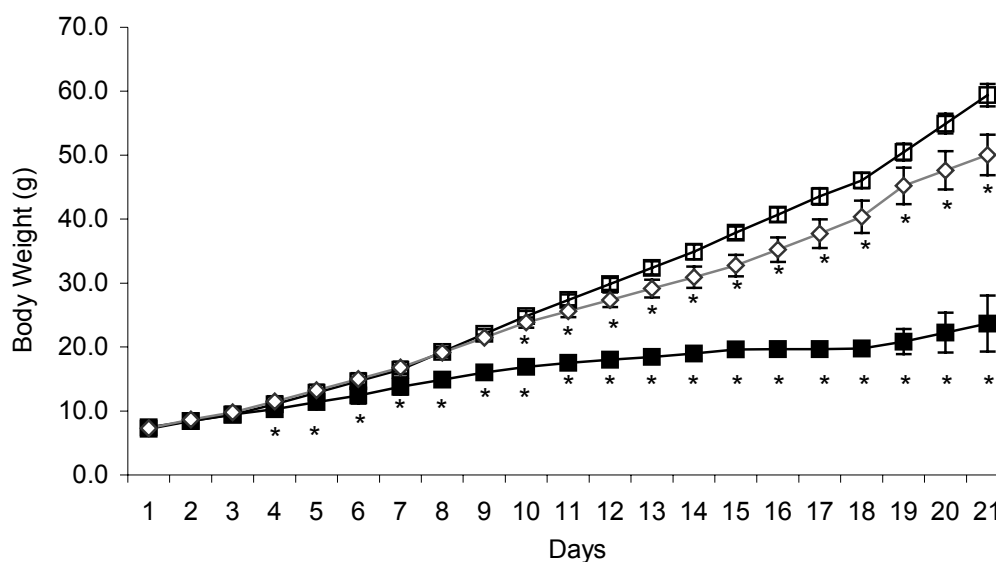


Figure 1: Evolution of body weight in rats during the suckling period. The animals were separated according to the diet the mother received: casein 17% (C17, $n=6$, $\square$), casein 8% (C8, $n=6$, $\diamond$), and the “regional diet basic” (RBD, $n=6$, $\blacksquare$). The animals were weighed daily. Data are expressed in means and standard deviation (SD). ANOVA was used to analyse differences between the groups. * = $P < 0.05$ compared to the casein 17%.

Table 2. Effects of neonatal malnutrition on the amplitude of the maximal M-wave (Mmax) and on the Hmax/Mmax and Tmax/Mmax ratios measured on wakeful weaning rats. Values represent mean $\pm$ SD, * significantly different from the C17% at $P < 0.05$.

RESPONSE	GROUPS	AMPLITUDE
Mmax	C17%	32.33 ± 4.18 mV
	C8%	31.72 ± 4.20 mV
	RBD	31.76 ± 6.12 mV
Hmax/Mmax	C17%	0.18 ± 0.03
	C8%	0.15 ± 0.03 *
	RBD	0.14 ± 0.03 *
Tmax/Mmax	C17%	0.26 ± 0.06
	C8%	0.23 ± 0.05
	RBD	0.20 ± 0.05 *

DISCUSSION

The present study reports some effects of neonatal malnutrition on the body weight and reflex excitability in weaning rats. For rats with a mother receiving a diet poor in protein (C8 group), the Hmax/Mmax ratio was lower and for rats with a mother receiving a diet poor in protein, vitamins and minerals (RBD group), both the Hmax/Mmax and the Tmax/Mmax ratio were lower than in the control group (C17).

Studies have already reported a reduction in body weight due to malnutrition during the critical period of development [18, 5]. The effects of neonatal malnutrition seem to have a persistent effect on growth in animals [19, 6]. Likewise, epidemiological evidence suggests that malnutrition during fetal and postnatal life predisposes to a high rate of diseases in adult life [20, 21]. These findings extend the idea that a critical development

period occurs [19] that affects the nervous system and, as reported in the present study, segmental motor control.

The average values of Mmax amplitude did not show any differences between the groups. It seems that malnutrition did not alter the direct activation of motor axons, the neuro-muscular coupling or the propagation of muscular action potentials (MAP). In fact, from the largely lower body weight of rats in groups C8 and RBD, smaller M responses were expected, bearing in mind that muscle fibre diameter increases with growth [22] and that MAP are of greater amplitude for muscle fibres of greater diameter [23]. However, the surface amplitude of the M wave did not seem very sensitive to this growth process. Recently, Grosset et al. [24] have reported the constancy of the peak-to-peak amplitude of the M wave for prepubescent children of different ages and for adult subjects. To explain this constancy of the M wave, the authors considered that surface electrodes of the same size and receptor field depict a relatively higher number of MAP in the case of a lower muscular mass and this higher number of MAP may compensate for their respective lower amplitude.

The analysis of the Hmax/Mmax ratio showed that motoneuron reflex excitability was lower in the C8 and RBD groups when compared with the C17 group. Changes in the amplitude of the reflex can be accounted for by at least three possibilities: 1- alteration in the excitability of the motoneurons; 2- variation in the amount of neurotransmitter released by the afferent terminals; or 3- variation in the intrinsic properties of the motoneurons [25, 26]. Thus, some of these processes can be induced by malnutrition. In the same way, at birth, the process of differentiation of different types of muscle fibres is not complete and there seems to be a relatively higher amount of Type II fibres than Type I fibres [27, 28]. In rats, the soleus muscle has approximately 73% type IIA and 26% type I fibres at both 6 and

11 days of age. However, type IIA fibres decrease to 44% and type I fibres increase to 56% at 16 days of age. This rapid shift in fibre composition continues up to 31 days of age, when the distribution becomes 25% for type IIA and 74% for type I fibres [27]. Hennemen and Olson [29] have shown that Type II fibres are less excitable than type I fibres because the former are innervated by the larger motoneurons. Thus, our results can be justified by a possible delay in the malnutrition-induced process of maturation of muscle fibres. Moreover, a number of studies have shown that perinatal malnutrition can interfere in the sensory action potential propagation in rats through alterations caused on the myelin sheath [11, 30]. However, it is still not clear how malnutrition can alter the intrinsic properties of motoneurons and the process of synaptic transmission between the Ia afferent and α -motoneurone.

The Tmax/Mmax ratio revealed a diminution only in the RBD group and none in the C8 group in comparison with the C17 group. Neuromuscular spindle sensibility depends on γ fusimotor motoneuron control [31] and changes in γ activation capacity may interfere with the tendinous reflex. Neuromuscular spindle maturation in rats extends from the gestation period to the first few weeks of postnatal life [32, 33]. It is possible that neonatal malnutrition may interfere with the neuromuscular spindle maturation process, interfering with the action of molecules that are important in spindle development [34]. Malnutrition alters some muscular characteristics [35, 36, 37] and thus may interfere with the viscoelastic properties musculotendinous, thereby altering the T-reflex [38].

The difference noticed in the RBD group - but not in the C8 group, when compared with the C17 group must have been due to the difference in nutritional content between the two diets. The RBD diet is hypoproteic, containing only 7.8% low biological level protein,

besides being deficient in vitamins and minerals [16]. But in addition to being hypoproteic, the C8 diet contains 8% high biological level proteins (casein) and a balanced amount of vitamins and mineral. Therefore, the RBD diet may cause more serious harm to developing organisms. Thus, the best quality C8 diet appears to induce a positive balance in the peripheral muscle process involved in the T reflex. It can compensate for the central alterations seen in the H reflex.

The phenotypic influence model proposes that the organism adapts favourably to an aggressive environment [20]. Epidemic evidence suggests that malnutrition during the fetal period and infancy predisposes the adult to a series of illnesses, such as type 2 diabetes and hypertension [8, 21, 39]. Malnutrition may act in the critical development period as an environmental stimulus to develop a “programming”, which will have subsequent effects upon the functions and structures of organic systems [8]. In the above study, it was observed that the organism adapts to perinatal malnutrition by programming the insulin metabolism [20, 39]. This adaptation tends to increase the organism’s resistance to a possible subsequent aggressive environment [7]. In theory, malnutrition could thus produce alterations to the neuromuscular system that would give the organism a better chance of survival during the aggression represented by malnutrition, although they might limit its functional capacity.

Conclusion

In conclusion, our findings confirm that neonatal malnutrition interferes with the reflex excitability of weaning rats. Nonetheless we do not yet know whether such changes are reversible after nutritional recovery.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES-COFECUB nº417/01, CNPq nº 402149-0, Edital MCT-CNPq - 51/2005.

References

- [1] MORGANE PJ, 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 central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978; 2: 137-230.
- [2] PESSOA DCNP, LAGO ES, TEODÓSIO NR, BION FM: Dietary proteins on reproductive performance in there consecutive generations of rats. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50: 55-61.
- [3] RESNICK O: Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosc Biobehav Rev* 1979; 3:233-46.
- [4] NOBACK C R, EISENMAN LM: Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *Anat Rec*1981; 201: 67-73.
- [5] BARROS KMFT, MANHÃES DE CASTRO R, CABRAL FILHO JE, MATOS RJB, SOUSA SL, DEIRÓ TCBJ, CANON F: A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* 2006; 9: 99-104.
- [6] DOBBING J: Undernutrition and the developing brain. *Am J D Child* 1970; 120: 411-415.
- [7] BARKER DJP: In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998; 95: 115-128.
- [8] HALES CN, BARKER DJP: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601.
- [9] GEISLER HC, WESTERGA J, GRAMSBERGEN A: Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol Exp* 1993; 53: 517- 523.

- [10] WALTON KD: Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience* 1992; 51: 763-767.
- [11] SEGURA B, GUADARRAMA JC, PRATZ G, MERCADO V, MERCHANT H, CINTRA L, JIMENEZ I: Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci Letters* 2004; 354: 181-184.
- [12] CHEN HH, HIPPENMEYER S, ARBER S, FRANK E: Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 96-102.
- [13] BALICE-GORDON RJ, THOMPSON WJ: Synaptic rearrangements and alterations in motor unit properties in neonatal rat extensor digitorum longus muscle. *J Physiol* 1988; 398: 191-210.
- [14] PÉROT C, ALMEIDA-SILVEIRA MI: The Human H and T reflex methodologies applied to the rat. *J Neurosci Methods* 1994; 51: 71-76.
- [15] REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC JR: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123 :1939-51.
- [16] TEODÓSIO NR, CABRAL-FILHO JE, GUEDES RCA: Regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990; 40: 533-547.
- [17] CHEN XY, WOLPAW JR: Circadian rhythm in rats H-reflex. *Brain Res* 1994; 648:167-170.
- [18] BARRETO-MEDEIROS JM, FEITOZA EG, MAGALHAES K, CABRAL-FILHO JE, MANHAES-DE-CASTRO FM, DE-CASTRO CM, MANHAES-DE-CASTRO R: Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* 2004; 7:49-52.

- [19] DAVISON AN, DOBBING J: The developing brain. In: Applied Neurochemistry (Davison, A. N., & Dobbing, J., eds), Oxford: Blackwell, 1968. p 253–286.
- [20] FORSDAHL, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic disease? Br J Prev Soc Med 1977; 31: 91–95.
- [21] HALES CN, BARKER DJP: The thrifty phenotype hypothesis. British Medical Bulletin 2001; 60: 5-20.
- [22] CHRIST B, BRAND-SABERI B: Limb muscle development. Int J Dev Biol 2002; 46: 905-914.
- [23] DE LUCA CJ: The use of surface electromyography in biomechanics. J appl Biomech 1997; 13:135-163.
- [24] GROSSET JF, MORA I, LAMBERTZ D, PEROT C: Changes in stretch reflexes and muscle stiffness with age in prepubescent children. J Appl Physiol, in press, 2007.
- [25] MISIASZEK JE: The H-reflex as a tool in neurophysiology: its limitations and uses in understanding nervous system function. Muscle Nerve 2003; 28: 144 – 160.
- [26] ZEHR EP: Considerations for use of the hoffmann reflex in exercise studies. Eur J Appl Physiol 2002; 86: 455-468.
- [27] HO KW, HEUSNER WW, VAN HUSS J, VAN HUSS WD: Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. J Embryol Exp Morphol 1983; 76:37-49.
- [28] WIRTZ P, LOERMANS H M TH, PEER P G M AND REINTJES A G M: Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in the mouse I. A histochemical and morphometrical investigation of normal muscle. J Anat 1983;137: 109-126.
- [29] HENNEMEN E, OLSON C B: Relations between structure and function in the desing of skeletal muscles. J Neurophysiol 1965; 28: 581-598.

- [30] SEGURA B, GUADARRAMA JC, GUTIERREZ AL, MERCHANT H, CINTRA L, JIMÉNEZ I: Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci* 2001; 4: 475-488.
- [31] PAILLARD J: Réflexes et régulations d'origine proprioceptive chez l'homme (Doutoral These). Arnette Ed., Paris, 1955; p 293.
- [32] MILBURN A: The early development of muscle spindles in the rat. *J Cell Sci* 1973; 12:175-195.
- [33] JIRMANOVÁ I, SOUKUP T: Critical period in muscle splindle regeneration in grafts of developing rat muscles. *Anat Embryol* 1995; 192: 283-291.
- [34] TOURTELLOTTE WG, KELLER-PECK C, MILBRANDT J, KUCERA J: The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interations during muscle spindle morphogenesis. *Dev Biol* 2001; 232: 388-399.
- [35] SILVADO CE, WERNECK LC: Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve* 2006; 34: 72-77.
- [36] CONDE MARTEL A, GONZALEZ REIMERS E, GONZALEZ HERNANDEZ T, SANTOLARIA FERNANDEZ F, MARTINEZ RIERA A, MARCHENA GOMEZ J. Muscular changes in experimental protein malnutrition. *Nutr Hosp* 1998; 13: 309-311.
- [37] WARD SS, STICKLAND NC: The effect of undernutrition in the early postnatal period on skeletal muscle tissue. *Br J Nutr* 1993; 69:141-50.
- [38] RACK PMH, WESTBURY DR. Elastic properties of the cat soleus tendon and their functional importance. *J Physiol* 347: 479-495, 1984.
- [39] OZANNE SE, HALES CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Nutr Society* 1999; 58: 615-619.



CAPÍTULO 3

Artigo 2: “Is reflex maturation in rats affected by neonatal malnutrition?”

Title: **Is reflex maturation in rats affected by neonatal malnutrition?**

Running title: **Neonatal malnutrition and reflex maturation.**

Authors: FREITAS-SILVA, S.R.¹, MANHÃES-DE-CASTRO R.¹, PÉROT C.²

¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, and ²Université de Technologie de Compiègne, UMR CNRS 6600, 60205 Compiègne, France.

*Corresponding Author: Chantal Pérot, UMR CNRS 6600, BP 20529 – 60205 Compiègne cedex – France. Telephone: +33 03 44 23 44 23 – Fax: +33 03 44 20 48 13. E-mail:chantal.perot@utc.fr

ABSTRACT

We have demonstrated previously that neonatal malnutrition reduces the reflex excitability in weaning rats. In the present study we investigated the maturation of reflex excitability, in rats submitted to a neonatal malnutrition, by measuring the H and T reflexes between weaning and adulthood. Rats were submitted to a diet with 18% protein (control group, n=6) or 7.8% (malnourished group, n=6), during suckling. The weight of the animals was measured and electrical stimulations of the sciatic nerve were applied in wakeful rats of different ages (21, 40, 60, and 90 days) to obtain the max direct motor response (Mmax) or the max Hoffman reflex (Hmax). Percussions on the Achilles tendon induced the T reflex. The Mmax, Hmax and Tmax responses in the triceps surae were analysed and characterized in latency and peak-to-peak amplitude. The knee-ankle external length was related to the H-latency value to express an indirect velocity index of nervous conduction along the reflex pathway. Neonatal malnutrition reduced body weight gain, H reflex latency, velocity index of nervous conduction but not reflex excitability as attested by two Hmax/Mmax or Tmax/Mmax ratios, with the exception of the Tmax/Mmax ratios at 21 days. Moreover, the reflex excitability increased with age in both groups, and there were no differences between the groups at the studied ages, though the Hmax/Mmax showed a delay in maturation in the malnourished group. In conclusion, our study suggests that neonatal malnutrition does not produce an irreversible diminution in reflex excitability in rats submitted to a normal diet after weaning.

Keyword: H reflex; T reflex; Nutritional deficiency; Development; Animal model.

INTRODUCTION

Neonatal malnutrition is liable to induce alterations in developmental morphogenetic events and interfere with the acquisition of adult physiologic patterns in the organism (Smart & Dobbing, 1971; Morgane et al. 1978). There is evidence that rats submitted to pre- or postnatal malnutrition show a retardation in the evolution of locomotor patterns (Gramsbergen & Westerga, 1992; Barros et al. 2006). It is also known that malnutrition and/or lack of vitamins can affect some aspects of neuromuscular function, for example the conduction of the sensorial action potentials (Da-Silva et al. 1987; Segura et al. 2004; Claus et al. 1984; Zegers de Beyl et al. 1988). We have demonstrated previously that neonatal malnutrition reduces reflex excitability in weaning rats (Freitas-Silva et al. 2007). Changes in reflex excitability have been demonstrated in rats after a period of training (Almeida-Silveira et al. 1996) or hypoactivity (Anderson et al. 1999) by the quantification of H, T and M responses in wakeful rats using the method proposed by Pérot and Almeida-Silveira (1994). The same method will be transferred to immature rats to evaluate reflex maturation in rats aged 21 and 90 days, and the possible repercussions of early malnutrition. The maturation of reflex control in children has been investigated by the characterization of H reflexes, especially in latency (Cruz Martinez et al. 1983; Prakash & Bhatia, 1997). The changes in H reflex latencies during the first few months of life were, in children, ascribed to an increase in conduction velocity due to the completion of the process of myelinisation (Cruz Martinez et al. 1983; Prakash & Bhatia, 1997). A number of studies have demonstrated that the process of myelinisation is affected by malnutrition (Da-Silva et al. 1987; Segura et al. 2004). The Hmax/Mmax quantification in children signaled a lower

in reflex excitability during the first year of life, followed by a slight increase in reflex excitability until the children were 4 years old, but it remained lower than adult values (Vecchierini-Bliveau & Guiheneuc, 1981). In prepubescent children the values of the Hmax/Mmax ratio did not change with age and did not differ from adults values, whereas the T/Mmax ratio increased with age but remained significantly lower than in adults (Grosset et al. 2007). In control rats, between the 1st and the 5th months, there was a rapid increase in the amplitude of H reflexes (Hort-Legrand et al. 2001), followed by a diminution in this parameter from the 14th month. However, it is not known in what way neonatal malnutrition affects reflex maturation. The aim of this paper was to assess the maturation of reflex excitability in rats submitted to neonatal malnutrition.

METHODS

Animals

Male Wistar rats (n=12) were used. Animals were kept at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, in a light-dark cycle (lights on from 6 a.m. to 6 p.m.). After mating and confirmation of gestation, the female rats were housed individually in polypropylene cages, with free access to water and a standard diet (Harlan Teklad Global 18% Protein Rodent Diet - 2018), containing in percentage terms, 18% protein, 5% fat, 57% carbohydrate and 340 Kcal% (see <http://www.teklab.com>). The neonates were randomly distributed, constituting litters of 6 pups per mother; they were breastfed during the first 21 postnatal days (lactation period); after weaning, all animals were given the standard diet. In the end of the study all the animals were killed by letal dose of anesthetic (urethane 0.5 mg/ml/100g bw).The experiment was approved by the Ethical Committee of the Center of Biological Sciences,

Federal University of Pernambuco, and followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals.

The nutritional groups were constituted according to the diet given to the mother during lactation control or well-nourished (C, n=6), which continued to receive the standard diet, or malnourished (M, n=6), which received the “regional basic diet” (RBD) starting from the day of birth. The constituents of the RBD are given in Table 1. This diet has a low protein level (7.8%), a low fat content and is also deficient in vitamins and some minerals (Teodósio et al. 1990).

Table 1: Centesimal Composition of Regional Basic Diet (RBD), a = cooked in water and dried.

Diet	Ingredients	g%	Centesimal Composition							Kcal%
			Protein	Carbohydrates	Fats	Ash	Fibers	Water-soluble vitamins	Fat-soluble vitamins	
RBD	Beans ^a	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	---	---	60.76
	Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	---	---	198.80
	Dried and salted meat ^a	3.74	2.74	---	0.06	0.06	---	---	---	11.50
	Dried and salted meat fat ^a	0.35	---	---	0.35	---	---	---	---	3.15
	Sweet potato	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	---	---	41.43
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	---	---	315.64

Teodósio, 1990.

Weight Evolution

Body weight was measured daily on a digital scale (Sartorius 1264 MP®, 0.01g sensibility), to determine weight evolution in the experimental groups.

Procedures in reflex testing

Since the method to record the reflexes was a noninvasive technique, without the use of an anaesthetic (Pérot & Almeida-Silveira, 1994), the reflexes were elicited and

followed in the same rats at different ages: 21 (age of weaning), 40, 60 and 90 days, always at the same time of day.

The reflex excitability of the plantar-flexor muscles was evaluated in both hind legs of rats in each experimental group. After trichotomy, surface Ag-AgCl electrodes (2 mm in diameter) were positioned on the gastrocnemius lateralis and kept in position by sticking plaster to record the electromyogram (EMG). The use of surface electrodes for EMG was preferred to the implantation of electrodes in order to limit stress and facilitate keeping the rats in the quiet state that is required for conducting reflex testing. Throughout the experiment the EMG was observed on a control oscilloscope (Tektronix TDS 3014[®]). The reference electrode was a needle pricked in the tail. After fixing the electrodes, the rat was placed in a lying position, in ventral decubitus, on the ergometer platform and kept in place manually. The paw sole of the paw was placed on a plate covered with adhesive tape. Leg withdrawal was avoided by placing a finger on the paw. The footplate was moved back and forth in order to adjust the knee and paw angles to about 90°.

M wave and H reflex

The stimulating electrodes (two rigid and cranked copper electrodes, 0.8 mm wide and 2 mm apart) were positioned along the sciatic nerve, parallel to the femur and maintained in position by the experimenter. The electrical stimulations were 0.2 ms in duration and between 2 - 10 mA. Stimuli were applied when the rat was quiet, and this quiet state was assessed by the lack of background EMG. The intensity of stimulations was gradually changed to obtain either maximum H responses or M wave in the oscilloscope. Around thirty electrical stimuli were applied.

T Reflex

The mechanical stimulations were applied on the Achilles tendon by means of an electromagnetic hammer adapted to the size of the animal. The tendon tap was adjusted in intensity to be painless and its intensity was constant for all animals. The hammer was positioned 1 mm from the tendon. When switched on, it moved forward about 2 mm, striking the tendon for about 20 ms. The hammer included a miniature force captor (FGP *sensors* -XFTC300[®]) which dated its contact with the skin. At least 20 tendon taps were imposed.

Data acquisition and treatment.

The electromyographic data were sent to an acquisition software program (Data Translation DT9800), with a sample frequency of 10 kHz, connected to a computer. Fifteen responses to each test were stored, and the 5 highest were chosen to make an average that gives a mean value for determining Hmax and Tmax. The same was done with Mmax, to which 10 responses were stored. The latency and peak-to-peak amplitude of each response were characterized. The mean Hmax or Tmax responses were expressed in percentages of the mean Mmax response. To indicate nerve conduction velocity, we created an index, named D/L (D= distance, in m, between knee and heel joints, L= latency of H reflex minus the latency of the M wave, in s). Results are expressed in means and standard deviation (SD). ANOVA was for comparison between the groups, followed by Fisher's least significant difference test (LSD). The nivel of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Body weight was lower in the M group, at all ages, than in the C group (Table 2). There was no difference in latency in Mmax between the groups at all ages (Table 2). Hmax latency was decreased in the M group at the age of 21, 40 and 60 days, when compared with the C group (Table 2). The D/L index was lowest at all ages in the M group (Table 2).

Table 2. Evolution of body weight BW (g), Mmax latency (ms), Hmax latency (ms) and D/L index (D = distance (m) between knee and heel joints; L = latency of Hmax reflex minus the latency of Mmax, in (s) during the maturation (21 - 90 days) in control (C) and malnourished (M) rats. Data are expressed in means and standard deviation (SD). ANOVA was for comparison between the groups, followed by Fisher's least significant difference test (LSD). (*= $p \leq 0.05$).

		Time (days)			
		21	40	60	90
BW (g)	C	72.0 $\pm$ 4.1	214.5 $\pm$ 15.4	353.8 $\pm$ 23.3	442.7 $\pm$ 27.7
	M	23.7 $\pm$ 4.4 *	123.4 $\pm$ 4.6 *	255.8 $\pm$ 14.6 *	335.2 $\pm$ 15.9 *
Latency Mmax (ms)	C	1.0 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.10	0.97 $\pm$ 0.05
	M	0.95 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.80	0.96 $\pm$ 0.13
Latency Hmax (ms)	C	7.0 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.2
	M	6.4 $\pm$ 0.3 *	6.0 $\pm$ 0.3 *	6.0 $\pm$ 0.2 *	6.3 $\pm$ 0.4
Index D/L (m/s)	C	6.6 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 0.5	12.5 $\pm$ 0.4
	M	5.3 $\pm$ 0.4 *	8.1 $\pm$ 0.4 *	9.3 $\pm$ 0.3 *	9.9 $\pm$ 0.2 *

The amplitude of Mmax increased progressively with age in both groups, but no statistical differences were seen (Figure 1).

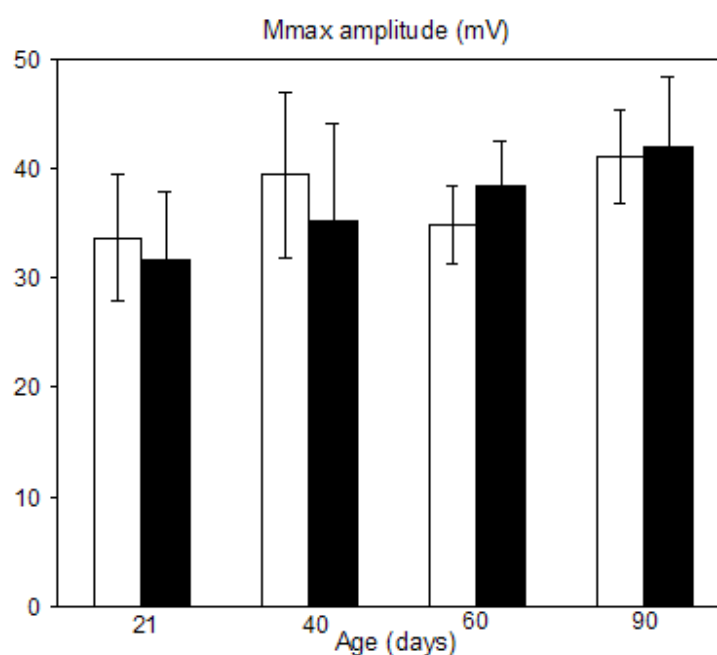


Fig. 1: Evolution of Mmax amplitude during the maturation of control (white histograms) and malnourished (black histograms) rats. Data are expressed in means and standard deviation (sd). Anova was for comparison between the groups, followed by Fisher's least significant difference test (LSD) ($p < 0.05$). No significant differences were found.

The Hmax/Mmax ratio increased progressively with age, showing a difference at the ages of 21 and 40 days, when compared with 90 days in both C and M groups. No differences were seen when comparing the C and M groups (Figure 2).

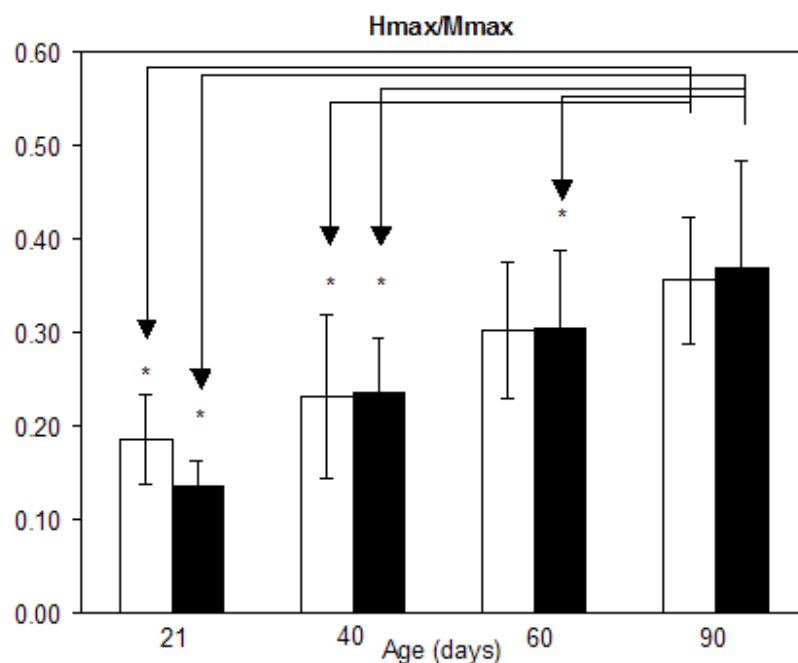


Fig. 2: Evolution of the Hmax/Mmax ratio during the maturation of control (white histograms) and malnourished (black histograms) rats. Data are expressed in means and standard deviation (sd). Anova was for comparison between the groups, followed by Fisher's least significant difference test (LSD) * indicated a difference within the group ($p < 0.05$).

The T_{max}/M_{max} ratio increased non progressively in both groups, showing differences at 21 and 40 days when compared with 90 days in both C and M groups. Only at 21 days was a difference seen when comparing the C and M groups (Figure 3).

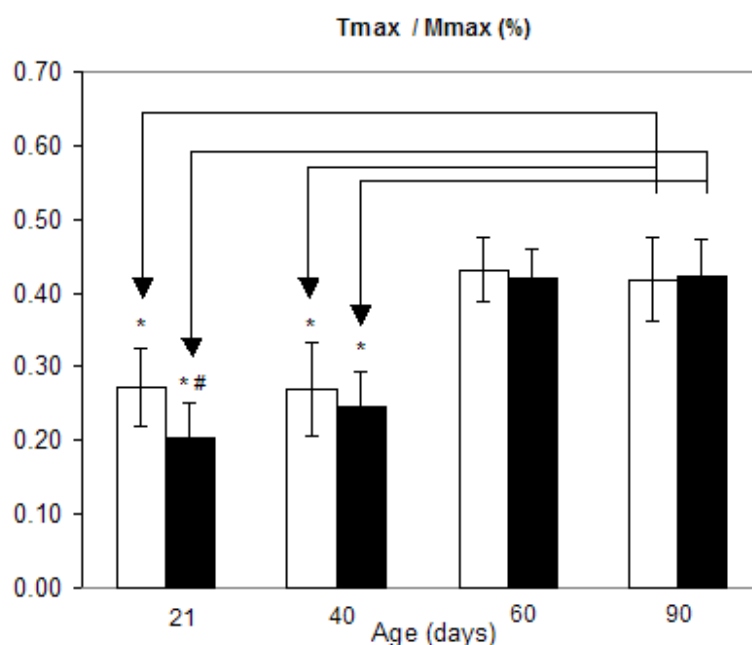


Fig 3 : Evolution of the Tmax/Mmax ratio during the maturation of control (white histograms) and malnourished (black histograms) rats. Data are expressed in means and standard deviation (sd). Anova was for comparison between the groups, followed by Fisher's least significant difference test (LSD), * indicates a difference within the groups and # a difference between groups ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The malnutrition imposed during the neonatal period induced a reduction in body weight both in the neonatal period and in adulthood, even after a long period of nutritional recovery. There was also a reduction in latency of the H reflex, which was reverted only in adulthood. No changes in either latency or amplitude were seen for the M-wave. Early malnutrition caused a persistent decrease in the nerve conduction velocity index. The analysis of Hmax/Mmax ratios indicated that the motoneuronal reflex excitability increased

progressively, reaching maturation value at the age of 60 days in the control group but not in the malnutrition group. However, Tmax/Mmax ratios point to a possible delay in the development of the muscle spindles and/or in the musculotendinous structures of the series-elastic component. On the 21th postnatal day a decrease in reflex excitability was observed in the malnourished groups as compared with the control group through the Tmax/Mmax ratio.

Reduction in body weight in neonatal malnourished animals in this study continued into adult age. The relationship between early nutrition and its consequences in adult life has been widely demonstrated. In 1960, Widdowson and Mccance demonstrated the permanent effect of early nutrition on the size of adult rats. Other studies have also shown that insults suffered during the nursing period can induce a growth reduction in rats (Teodósio et al. 1990; Barros et al. 2006).

It is worth pointing out that the effects of malnutrition at a time as critically important for development as the neonatal period (Morgane et al. 1978) may persist into adult life, even if the malnutrition occurred during this early period. The theory of a critical period for development, initially elaborated to describe the irreversible effects of early malnutrition on the development of the brain (Morgane et al. 1978), has been widened. One particular study supports epidemiological evidence that malnutrition during fetal life and in childhood predisposes to a wide range of diseases in adult life (Hales & Barker, 1992, 2001). The basic mechanism in this theory has been referred to “programming”, where an environmental stimulus at a certain moment of development could have a permanent effect on the definitive structures and their functions in the organism (Hales & Barker, 1992, 2001). Thus, even if it was only temporary, neonatal malnutrition could produce permanent

alterations in the organism. The present study analyses M waves, H and T reflexes to provide a basis for the possible repercussions of malnutrition on reflex excitability.

The mean values of latency and amplitude of Mmax in our study did not show any differences between controls and malnourished rats. It is reported that there is an increase in Mmax responses during fetal life and early life in humans and rats, due to hyperplasia of muscle fibres (Antonio & Gonyea, 1993). An increase in muscle fibre diameter also leads to changes in velocity conduction and in the amplitude of action potentials in motor units (De Luca, 1997). However, these changes were not seen in our study. It is possible that alterations in fibre diameter or in subcutaneous tissue thickness could explain our results. Moreover, experiments were conducted after the breastfeeding period, the time when malnutrition was imposed.

In our study, the analysis of the Hmax/Mmax ratio showed that reflex excitability increased progressively, reaching its maturation pattern at the age of 60 days in group C. Concerning work in humans, Vecchierini-Blineau and Guiheneuc (1981) studied the amplitude of the monosynaptic reflex in children. They observed a gradual decrease in the amplitude of the H reflex throughout the first few years of life, followed by a slight increase up to the age of 4 years. However, these values remain lower than those observed in adults. In prepubescent children (7 to 11 years old), it was noted that the values of the Hmax/Mmax ratio did not change with age and did not differ from adult values (Grosset et al. 2007). These alterations in the amplitude of the H reflex during early childhood could be attributable to maturation processes in the nervous system and to changes in presynaptic inhibitory phenomena and in synaptic efficacy (Pierrot-Dseilligny & Mazevet, 2000; Vecchierini-Blineau & Guiheneuc, 1981). In rats, it was observed that the amplitude of the H reflex increases rapidly between the 1st and the 5th months, during the maturation of the

peripheral nervous system (Hort-LeGrand et al. 2001). Thus, for nourished rats, the progressive increase in reflex excitability up to the age of 60 days may correspond to the normal maturation of neuromuscular structures.

In our results there was no differences between the groups, even if a difference was seen before with the testing procedures. In a previous study, it was observed a reduction of reflex excitability in the animals submitted to neonatal malnutrition (Freitas-Silva et al. 2007). Nevertheless, only three groups at the same age were compared, what allow us to think that statistical analyses could be responsible for the absence of statistical difference between groups. Also, in this work, it was suggested postnatal fiber type differentiation processes could be delayed by malnutrition (Ho et al, 1983), so there could be a relatively higher amount of Type II fibres than Type I fibres. As a consequence, reflex excitability could also be changed: the higher is type II fiber number, the less would be muscle excitability response (Hennemen & Olson 1965). Perinatal malnutrition produces a reduction in the amplitude of the action potencial elicited in the sensory nerves in rats (Segura et al. 2004). Barros et al (2006) have shown a delay in the ontogeny of reflexes and locomotor activity in malnourished rats, relating their findings to the impact of malnutrition on neuromuscular development. The alterations the H reflex are interpreted as changes in synaptic efficacy in the release of neurotransmitters and/ or motoneuronal excitability (Misiaszek, 2003; Zehr, 2002; Voerman e col, 2005). However, it is still not clear how malnutrition can alter the intrinsic process of synaptic transmission between the Ia afferent and α -motoneurone and the properties of motoneurones.

On the other hand, the stabilization of the reflex amplitude from the age of 4 years until adulthood may be attributable to the fact that fibre type differentiation in flexor

muscles of the ankle is already defined by that age (Elder & Kakulas, 1993). According to our results, a gradual increase in the Hmax/Mmax ratio was seen up to the age of 60 days. If we compare development in humans and rats, we can see that the muscle system reaches its maturity at 210 days in the rat, while in humans it occurs at the age of 20 years (Quinn, 2005). This means, with regard to muscle, that the age of 60 days – the end of maturation of reflex excitability - used in our study corresponds to a stage lasting 5 years in humans, which seems to correspond to the data of Vecchierini-Blineau and Guiheneuc (1981). It must be emphasized that the development of several organic systems in the rat follows the same steps as it does in humans (Morgane et al. 1978).

The Tmax/Mmax ratios also showed an increase with age for both groups. Grosset et al. (2007) noted that the T/Mmax ratio increased with age but remained significantly lower in prepubescent children than in adults. Nevertheless, in our results there was no linear increase in the T reflex between the different ages studies like the one observed in the H reflex. As is generally known, the T reflex depends not only, as with the H reflex, on central mechanisms (motoneuronal excitability and synaptic efficacy) but also on peripheral factors such as the degree of gamma motoneuron activation, muscle spindle sensibility (Miwa et al. 1995) and muscle spindle solicitation through more or less stiff elastic tendinous structures (Rack, 1984). Our results in control rats indicate an increase in muscle spindle solicitation with age, but the mechanisms responsible (one or other of the mechanisms mentioned above) for this increase cannot be differentiated. Likewise, a decrease in the T reflex of the undernourished group compared to the controls at 21 days, may suggest that the spindle solicitation is altered by malnutrition. A number of studies have demonstrated that malnutrition is able to alter muscle development and structure (Silvado & Werneck, 2006; Fiorotto et al. 2000). Through the analysis of biomechanical

aspects of muscle, it was found that malnutrition can alter muscular performance in adult rats, even if imposed for short periods, by altering characteristics such as tension, relaxation and fatigue (Bissonette et al. 1997). It remains to be analysed whether the elastic properties of tendons and other structures linked to the muscle spindles are also altered by malnutrition, contributing to the lower T reflexes. Such changes in tendon stiffness have been related to alterations in T reflex amplitudes in the rat (Almeida-Silveira et al. 1996) and in humans (Lambertz et al. 2002). It is also possible that malnutrition modifies spindle efficacy. Even though these effects may be reversed following nutritional recovery.

Malnutrition seems to produce a reduction in the latency of the h reflex, reversed only in adulthood. This can be the result of the reduction in length of the sciatic nerve in undernourished animals, which means a shorter course to be travelled by the action potential. In humans, it has already been demonstrated that the length of the nerve clearly affects the latency of the h reflex (Cruz Martinez et al. 1983). In children, it has been shown that h reflex latency follows a downward progression from birth during the first year of life, which is followed by a subsequent increase in this value (Prakash & Bhatia, 1997). The decrease during the first few months of the life is explained by the increase in the conduction velocity of the nerve potentials due to the maturation process of the myelin sheath. Once this process has been completed, h reflex latency increases with the child's growth. Stanley (1981) reports a reduction in latency of the h reflex and an increase in the velocity of nervous conduction during growth from the age of 4 weeks to 18 months in Sprague-Dawley rats. We have also observed an increase in the d/l index, which represents the conduction velocity during growth in both groups. However, this increase was lower in the undernourished group than in the controls. Nevertheless, the reduction in h reflex latency minus the latency of the m-wave, observed in the undernourished group, cannot be

attributed to an increase in the velocity of nerve conduction. In this connection, the index calculated in our study indicates that undernourished animals had a reduction in conduction velocity of the afferent and efferent messages transmitted along the ia –d pathway and this result confirms previous data regarding the conduction velocity along the sciatic nerve (da-silva et al. 1987) and along the sensory sural nerve (segura et al. 2004). These effects on conduction velocity are attributable to damage to the myelin sheath in postnatal development (segura et al. 2004). In two studies (da-silva et al. 1987, segura et al. 2004) the consequences for the nervous function of undernourished animals can be attributed to the amount or quality of the diet, especially with regard to the protein content. However, when malnutrition is imposed only in adulthood, it does not appear to modify conduction velocity (da-silva et al. 1987).

In conclusion, our findings document the maturation of reflex activities in control rats aged between 21 and 90 days. This study also reports that some reflex parameters are altered due to malnutrition imposed during the neonatal period. The altered parameters seem to involve the peripheral components of the reflex pathway such as axonal conduction velocity and spindle solicitation. Also the central components, such as strong synaptic connections between ia afferents and alpha motoneurons, the factors mainly responsible for the h-reflex amplitude, are affected by the malnutrition. Furthermore, our study suggests that neonatal malnutrition does not produce an irreversible diminution in reflex excitability in rats submitted to a normal diet after weaning.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES-COFECUB nº 417/01, CNPq nº 402149-0, Edital MCT-CNPq - 51/2005.

References

- 1) ALMEIDA-SILVEIRA MI, PÉROT C & GOUBEL F (1996). Neuromuscular adaptations in rats trained by muscle stretch-shortening. *Eur J Appl Physiol* 72, 261-266.
- 2) ANDERSON J, ALMEIDA-SILVEIRA MI & PÉROT C (1999). Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J Exp Biol* 202, 2701 – 2707.
- 3) ANTONIO J & GONYEA WJ (1993). Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med Sci Sports Exercice* 25, 1333 –1345.
- 4) BARROS KMFT, MANHÃES DE CASTRO R, CABRAL FILHO JE, MATOS RJB, SOUSA SL, DEIRÓ TCBJ & CANON F (2006). A regional model (northeast brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* 9, 99-104.
- 5) BISSONETEE DJ, MADAPLLIMATAM A & JEEJEEBHOY KN (1997). 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* 66(2), 293-303.
- 6) CLAUS D, NEUNDORFER B & WARECKA K (1984). The influence of vitamin b6 deficiency on somatosensory stimulus conduction in the rat. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 234(2), 102-105.
- 7) CRUZ MARTINEZ A , FERRER MT & MARTIN MJ (1983). Motor conduction velocity and h-reflex in prematures with very short gestational age. *Electr Clin Neurophysiol* 23, 13 – 19.

- 8) DA-SILVA AT, COSTA FB, COSTA JA, TEODOSIO NR, CABRAL-FILHO JE & GUEDES RC (1987). Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the northeast of brazil. *Braz J Med Biol Res* 20(3-4), 383-92.
- 9) DE LUCA CJ (1997). The use of surface electromyography in biomechanics. *J Appl Biomech* 13, 135-163.
- 10) ELDER GCN & KAKULAS BA (1993). Histochemical and contractile property changes during human muscle development. *Muscle And Nerve* 16, 1246-1253.
- 11) FIOROTTO ML, DAVIS TA & REDES PJ (2000). Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278(4), 845-854.
- 12) FREITAS SILVA SR, MANHÃES-DE-CASTRO R & PÉROT C (2007). Neonatal malnutrition changes the h- and t-reflexes in weaning rats. *Nutrition Research* submitted.
- 13) GRAMSBERGEN A & WESTERGA J (1992). Locomotor development in undernourished rats. *Behav Brain Res* 48(1), 57-64.
- 14) GROSSET JF, MORA I, LAMBERTZ D & PEROT C (2007). Changes in stretch reflexes and muscle stiffness with age in prepubescent children. *J Appl Physiol* in press.
- 15) HALES, CN & BARKER DJ (1992). Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35: 595-601.
- 16) HALES CN & BARKER DJP (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60, 5-20.

- 17) HORT-LEGRAND C, LESTRADE R & BEHAR A (2001). Motor and sensory conduction velocities and amplitude of nerve or muscle potentials in the normal rat according to age. *Acta Physiol Hung* 88(3-4), 239-249.
- 18) LAMBERTZ D, GOUBEL F & PÉROT C (2002). A method to evaluate reflex excitability of the human ankle plantar flexors despite changes in maximal activation capacities. *Exp Brain Res* 143, 89 – 99.
- 19) MISIASZEK JE (2003). The h-reflex as a tool in neurophysiology: its limitations and uses in understanding nervous system function. *Muscle & Nerve* 28, 144-160.
- 20) MIWA T, MIWA Y & KANDA K (1995). Dynamic and static sensitivities of muscle spindle primary endings in aged rats to ramp stretch. *Neurosci Lett* 201, 179-182.
- 21) MORGANE PJ, MILLER M, KEMPER T, STERN W, FORBES W, HALL R, BRONZINO J, KISSANE E, HAWRYLEWICZ E & RESNICK O (1978). The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2, 137-230.
- 22) PÉROT C & ALMEIDA-SILVEIRA MI (1994). The human h and t reflex methodologies applied to the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 51, 71-76.
- 23) PIERROT-DSEILLIGNY E & MAZEVET D (2000). The monosynaptic reflex: a tool to investigate motor control in humans. Interests and limits. *Neurophysiol* 30, 67-80.
- 24) PRAKASH U & BHATIA BD (1997). H-reflex latency: a maturity criterion for newborn babies. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 37, 435-437.
- 25) QUINN R (2005). Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21, 775-777.

- 26) RACK PMH & WESTBURY DR. Elastic properties of the cat soleus tendon and their functional importance. *J Physiol* 347: 479-495, 1984.
- 27) SEGURA B, GUADARRAMA JC, PRATZ G, MERCADO V, MERCHANT H, CINTRA L & JIMENEZ I (2004). Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci Letters* 354, 181-184.
- 28) SILVADO CE & WERNECK LC (2006). Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve* 34, 72-77.
- 29) SMART JL & DOBBING J (1971). Vulnerability of developing brain. ii. effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research* 28, 85-95.
- 30) STANLEY EF (1981). Sensory and motor nerve conduction velocities and the latency of the h reflex during growth of the rat. *Experimental Neurology* 71: 497-506.
- 31) TEODÓSIO NR, CABRAL-FILHO JE & GUEDES RCA (1990). Regional basic diet from northeast brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 40(4), 533-547.
- 32) VECCHIERINI-BLINEAU MF & GUIHENEUC P (1981). Excitability of the monosynaptic reflex pathway in the child from birth to four years of age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44, 309-314.
- 33) VOERMAN GE, GREGORIC M & HERMENS HJ (2005). Neurophysiological methods for the assessment of spasticity: the hoffmann reflex, the tendon reflex, and the stretch reflex. *Disability and Rehabilitation* 27(1/2), 33-68.
- 34) WESTERGA J & GRAMSBERGEN A (1993). Development of locomotion in the rat: the significance of early movements. *Early Hum Dev* 34(1-2), 89-100.

- 35) WIDDOWSON EM & MCCANCE RA (1960). Some effects of accelerating growth i. general somatic development. Proc R Soc Ser B 152, 188–206.
- 36) ZEGERS DE BEYL D, DELECLUSE F, VERBANCK P, BORENSTEIN S, CAPEL P & BRUNKO E (1988). Somatosensory conduction in vitamin b12 deficiency. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 69(4), 313-318.
- 37) ZEHR PE (2002). Considerations for use of the hoffmann reflex in exercise studies. Eur J Appl Physiol 86, 455-468.



CAPÍTULO 4

Artigo 3: “Effects of protein supplementation on a devoid diet in the evolution of locomotor activity in rats”.

Title: Effects of protein supplementation on a deficient diet in the evolution of locomotor activity in rats.

Authors: FREITAS-SILVA, S.R.¹, BARROS, K.M.F.TA.², TOSCANO, A.E.², NÓBREGA, T. H. M.², ARAÚJO FILHO, J.C.², ARAGÃO R.S.², MELO, C. H. S.³, FERREIRA L.M.P.¹, SOUZA R. E.³, PÉROT C.⁴ & MANHÃES-DE-CASTRO R.¹.

¹Departamento de Nutrição, ²Departamento de Fisioterapia, ³Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil and ⁴Université de Technologie de Compiègne, UMR CNRS 6600, 60205 Compiègne, France.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of protein supplementation in a deficient diet, during the neonatal period, on locomotor activity in rats. Physical variable had been extracted from the observation of the behavior of rats in an open field, using digital video recording and processing of the images. **Methods:** Wistar male rats were divided in to three groups during the breast-feeding period: Casein 17% (C17, n=20); “Regional Basic Diet” (RBD, n=18, hypoproteic: 7,8%) and RBD supplemented (RBD_{Sup}, n=20, supplemented with protein to reach 17%). At the ages of 8, 14 and 21 days, the weight of the animals was recorded and the animals were filmed for two minutes in a circular open field (Ø 1m), using a combined sistem consisting of a CCD camera, video card, microcomputer and software. Through techniques of digital processing of images, average speed, distance covered, average power, number of stops and period of time which the animal remained motionless during the recording were calculated. For data comparisons between the groups, a two-way ANOVA was used, followed by the Holm-Sidak test (*=p<0.05). **Result:** There was a body weight reduction in the RBD and RBD_{Sup} groups as compared with the C17 group (p<0.05). On day 14, the C17 group achieved a longer distance and had a higher average speed than the RBD group (p<0.05) and was no different from the RBD_{Sup} group. Average power was greater (p<0.05) on day 21 in the C17 group when compared to the RBD_{Sup} and RBD groups, and the RBD_{Sup} group showed a greater average power than the RBD group. **Conclusions:** Protein supplementation of the RBD diet produced a minimization of the alterations in somatic and locomotor development normally caused by malnutrition to in weaning rats.

Key words: locomotor activity, protein supplementation, neonatal period, rats

*Corresponding Author: Raul Manhães de Castro, Nutrition Department, Center of Sciences of Health, UFPE. Avenida Moraes Rego, 1235 – 50670-901, Recife – PE, Brazil. Fax: +55-81-2126-8473. Email: raul.castro@ufpe.br

Introduction

The events related to motor development follow a predetermined sequence that is typical of each species. Accordingly, an ontogenetic sequence for motor development was verified in rats and mice (Fox, 1965; Smart & Dobbing, 1971; Gramsbergen, 1998). An initial period of reflex movement is observed, strongly directed towards activities related to conserving body temperature and obtaining food (Smart & Dobbing, 1971). The following period is marked by the inhibition of the primitive reflex and the attainment of an apparently more voluntary control (Fox, 1965). At the end of the second week of life, the movement and locomotion patterns become more similar to those of the adult animal (Gramsbergen, 1998). At weaning, the rat shows a complete set of movements that is similar to that of the adult rat; however this repertoire continues to evolve still evolves during the growth and sexual maturation phases, towards coordination refinement (Walton et al., 1992). The breastfeeding period, which corresponds to the rat's first three weeks of life, can therefore be considered a critical period for the development of locomotion (Walton et al., 1992; Gramsbergen, 1998). Nutritional aggressions during the neonatal period can negatively affect the process of locomotor development (Barros et al., 2006). The evaluation of motor ontogenesis is a tool largely used in the diagnosis of dysfunctions of neuromuscular and psychomotor development at the beginning of life (Barros et al., 2006; Eickman et al., 2004). Moreover, experimental models of malnutrition are used to estimate the harmful effect of the lack of nutrients and in particular of proteins in laboratory animals (Teodósio et al., 1990; Lago et al., 1993). Also, supplementation of deficient diets may be used as an important tool in underdeveloped countries to lessen the deleterious effect of malnutrition (Teodósio et al., 2000). Even so, too little is known about whether the use of protein supplementation in

deficient diets can specifically contribute to the development of locomotor activity in neonate animals. The purpose of this study was to evaluate the effect of protein supplementation in a deficient diet, on locomotor activity development in malnourished rats during the neonatal period. Physics variables were extracted from the observation of the behavior of rats in an open field, using digital video recordings and processing of the images obtained.

Methods

Animals and nutritional treatment

Male Wistar rats were separated into 6 rats per litter after birth. The animals were kept in an inverted light/dark cycle bioterium (lights on between 21:00h and 09:00h), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and with free access to water and food. Mothers were divided into three groups during breast-feeding period: the first received the Casein 17% of protein (C17, n=18) diet; the second received the “Regional Basic Diet” (TEODÓSIO et al., 1990) containing 7.8% of protein, besides being multideficient in mineral and vitamins (RBD, n=18); and the third received the “Regional Basic Diet” supplemented with casein to reach a protein content of 17% (RBD_{Sup}, n=18). The nutritional treatment was imposed on the litters by the mothers. The ingredients of all the diets are presented in Table 1. The experiment was approved by the Ethical Committee of the Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, and followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals.

Weight Evolution

Body weight was measured on the day of the experiment on a digital scale (Sartorius 1264 MP®, 0.01g sensibility), to determine weight evolution in the experimental groups.

Recording locomotor activity

Locomotor activity was studied between 12:00 and 14:00h. The litters were evaluated during the breast-feeding period at the ages of 8, 14 and 21 days, using a movement monitoring system. The system consists of a circular open field ($\varnothing 1\text{m}$), delimited by walls 30 cm high, on which the animals' walking pattern is accurately recorded, during a preset interval of two minutes. From this recording, several physical variables are extracted and subsequently processed in order to obtain information on the behavior of the animal.

Table 1: Centesimal Composition of Casein 17% of protein diet (C17), "Regional Basic Diet" (RBD) and "Regional Basic Diet Supplemented (RBD_{Sup}).

Diet	Ingredients	g%	Centesimal Composition (g)							Kcal%
			Protein	Carbohydrates	Fats	Ash	Fibres	Vitamins	Minerals	
C17 [§]	Casein ($\geq 92,5$)	18.38	17.00	---	---	---	---	---	---	68.00
	Maisena	64.57	---	58.11	---	---	---	---	---	232.44
	Soybean oil	7.00	---	---	7.00	---	---	---	---	63.00
	Fibres	5.00	---	---	---	---	5.00	---	---	---
	Mix vit	1.00	---	---	---	---	---	1.00	---	---
	Mix min.	3.50	---	---	---	---	---	---	3.50	---
	Bit. Cholin	0.25	---	---	---	---	---	0.25	---	---
	L-Metionin	0.30	0.30	---	---	---	---	---	---	---
	TOTAL	100.00	17.30	58.11	7.00	---	5.00	1.25	3.50	363.44
RBD*	Beans ^a	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	--	--	60.76
	Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	--	--	198.80
	Dried and salted meat ^a	3.74	2.74	--	0.06	0.06	--	--	--	11.50
	Dried and salted meat fat ^a	0.35	--	--	0.35	--	--	--	--	3.15
	Sweet potato	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	--	--	41.43
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	--	--	315.64
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	--	--	315.64
RBD _{Sup}	Beans ^a	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	---	---	60.76
	Manioc flour	54.56	0.71	40.90	0.10	0.43	5.64	---	---	167.34
	Dried and salted meat ^a	3.74	2.74	---	0.06	0.06	---	---	---	11.50
	Dried and salted meat fat ^a	0.35	---	---	0.35	---	---	---	---	3.15
	Sweet potato	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	---	---	41.43
	Casein ($\geq 92,5$)	9.95	9.20	---	---	---	---	---	---	39.80
	L-Metionin	0.30	0.30	---	---	---	---	---	---	---
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	---	---	323.98
	TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	---	---	323.98

§ AIN -93 based diets, except for the protein content of diet C8.

* Regional basic diet from northeast Brazil (TEODÓSIO et al., 1990).

^a Cooked in water and dried.

Filming was started when the animal was located in the center of the open field, which has a black bottom. The filming was performed with a digital camera (VTR[®] 6638 – CCTV System) positioned on a line vertical with the center of the open field, fixed to the ceiling of the room which was 2.65 m high. It is equipped with an infra-red ray sensor and an illumination LED. The camera has a resolution of 420 lines and a speed of between 1/60 and 1/100 s, and its sensibility allows it to record images with minimum illumination, up to 0.1 lux. It also has a camera which possesses internal synchronization with the video card. The video is thus sent to a computer equipped with a video capture card and software dedicated to image recording tasks through an interface (Figure 1).

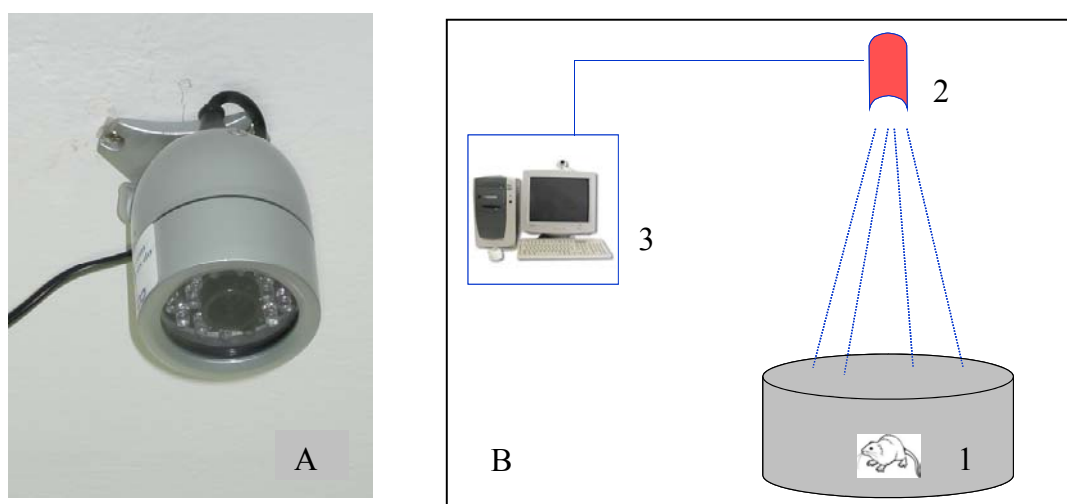


Figure 1: A – image-recording camera; B – schematical representation of the monitor system of the locomotor activity in small animals (1 – open field, 2 - camera and 3 – computer for video recording).

Inside the computer, the video is converted into frames (approximately 180 for each 2-minute recording with a time interval of 0.662s between frames) for later processing. For the analysis of the recorded images, one frame was selected for each 20 recordings.

Through digital image processing techniques, each frame was filtered in order to isolate the holder of the objects in the open field borders (Figure 2). In the following stage the coordinates of the frame-to-frame image of the animal were determined and thus it was possible to reconstruct the animals' walking trajectory.

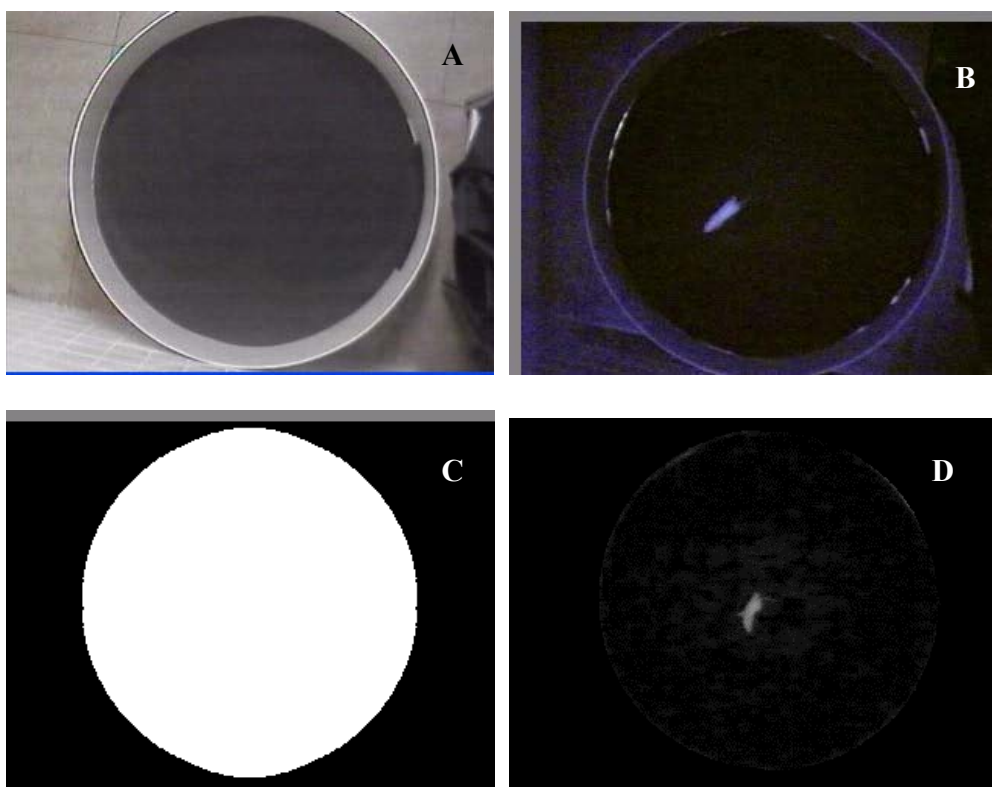


Figure 2: Image sequence used in the recording of locomotor activity. A) Image of the open field in a light environment, used for the system calibration; B) Example of an image of a rat in free movement in the open field, recorded in a dark environment; C) Mask manufactured in the computer when recording the open field in a light environment, used to isolate the image of the animal in the field from other objects; D) Final image, used in the processing and calculations.

A set of software was also developed for obtaining and extracting pictures from several video formats, using the *Object Pascal* programming language, and a MATLAB[®] based system for image processing, semiautomatic segmentation and calculation of the physical variables of interest. In possession of the trajectory covered, the time interval

between the frames and the animal's mass, it was possible to calculate the covered distance, the average speed, the average power, the number of stops and the period of time during which the animal remained motionless while the interval was recorded.

Statistical Analysis

The data was analyzed statistically using SigmaStat[®] software. To compare the effects of age (maturation) and diet between the groups, Two-way Variance Analysis was used, followed by the Holm-Sidak test $p < 0.05$.

Results

There was a gradual increase in body mass in the C17 and RBD_{Sup} groups over the days studied ($p < 0.05$). Only in the RBD group was no significant increase in the mass observed between the 14th and 21st days of age. The RBD and RBD_{Sup} groups showed a reduction in body weight at all ages compared with the C17 group (Figure 3). Compared with the RBD group the RBD_{Sup} group showed a greater body mass ($p < 0.05$) at 14 and 21 days.

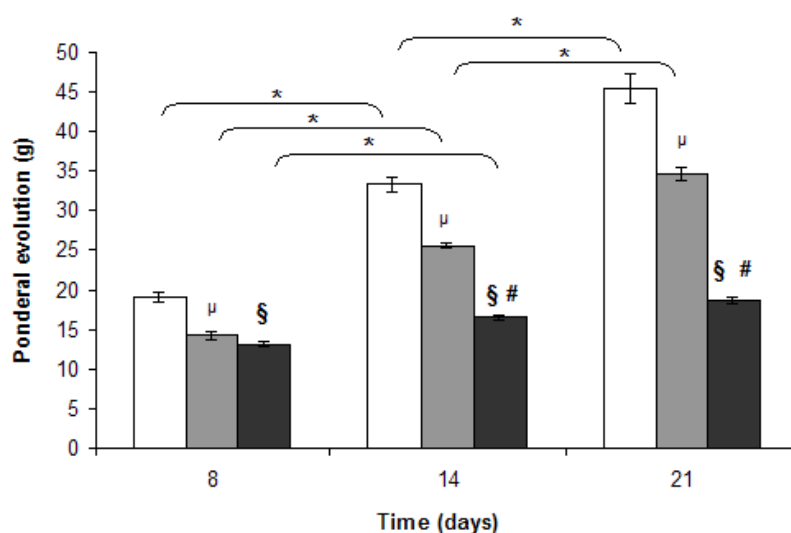


Figure 3 – Ponderal evolution (g) of Casein 17% of protein (C17, white histogram), Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD_{Sup}, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, on the 8th, 14th and 21st days of postnatal life. Two-way Anova, followed by Holm-Sidak, $p < 0.05$. * = 8 vs 14 days and 14 vs 21 days; μ = C17 vs RBD_{Sup}; § = C17 vs RBD; # = RBD_{Sup} vs RBD. Data expressed in $\bar{x} \pm EP$.

The distance covered gradually increased in all the groups at the observed ages ($p < 0.05$). In the comparison between the groups no difference was found on days 8 and 21, however, on day 14 day in the C17 group, the distance covered was greater than in the RBD group and equal to the RBD_{Sup} group. The RBD_{Sup} group showed a greater distance covered than the RBD group ($p < 0.05$) (Figure 4).

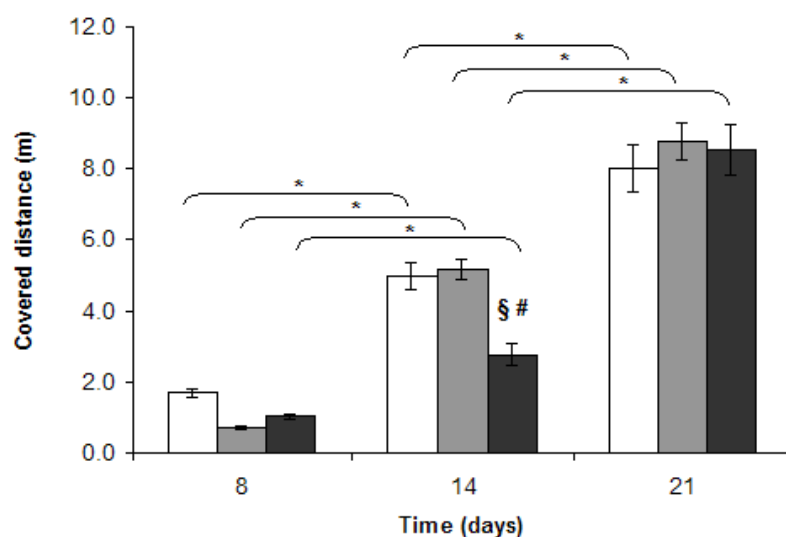


Figure 4 – Covered distance (m) of Casein 17% of protein (C17, white histogram), Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD_{Sup}, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, in the 8th, 14th and 21st days of postnatal life. Anova Two-way, followed by Holm-Sidak, $p < 0.05$. § = C17 vs RBD; # = RBD_{Sup} vs RBD; * = 8 vs 14 days and 14 vs 21 days. Data expressed in $\bar{x} \pm EP$.

The average speed increased gradually in all groups over the days studied ($p < 0.05$). In the comparison between groups, similarities with the results of the previous parameters were observed, no differences being observed on the 8th and the 21st days, but the C17 group showed a higher average speed on day 14 than the DBR group and speed equal to

that of the RBD_{Sup} group. Also, the RBD_{Sup} group showed a higher speed in relation to the RBD group on day 14 ($p < 0.05$) (Figure 5).

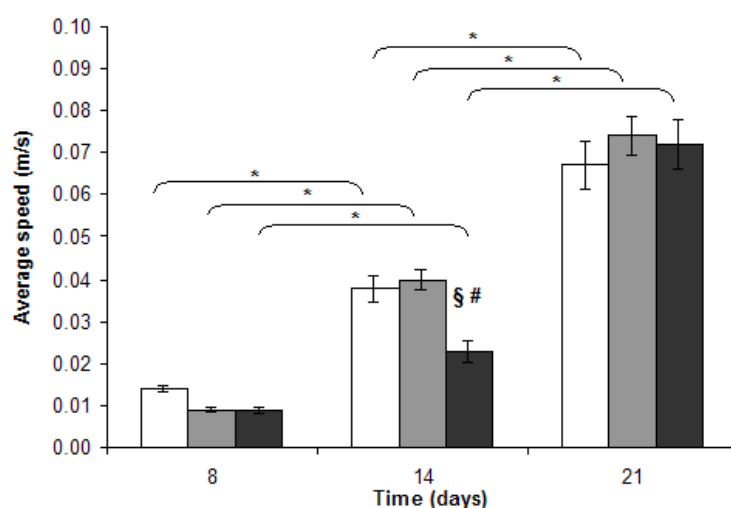


Figure 5 – Average speed (m/s) of Casein 17% of protein (C17, white histogram), Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD_{Sup}, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, on the 8th, 14th and 21st postnatal days. Two-way Anova, followed by Holm-Sidak, $p < 0.05$. § = C17 vs RBD; # = RBD_{Sup} vs RBD; * = 8 vs 14 days and 14 vs 21 days. Data expressed in $\bar{x} \pm EP$.

The average power showed a progressive increase ($p < 0.05$) in all groups through the ages studied (Figure 6). There was no difference between the groups on the 8th and 14th days of age. Compared with the C17 group, the malnourished groups showed a reduction in this parameter on the day 21st ($p < 0.05$). However, the RBD_{Sup} group showed a greater average power in relation to the RBD group on the day 21st ($p < 0.05$).

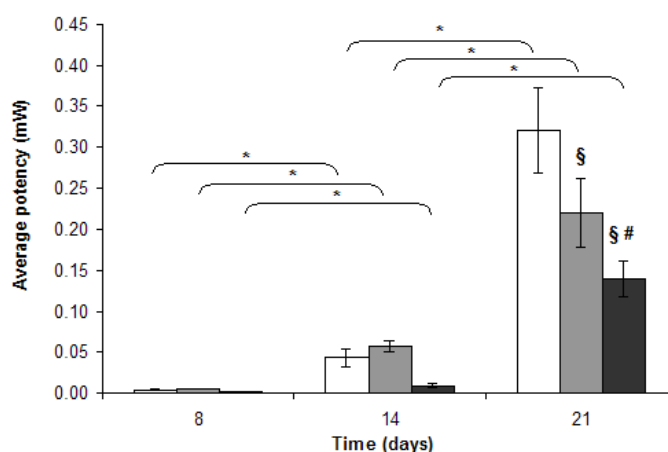


Figure 6 – Average power (mW) of Casein 17% of protein (C17, white histogram), Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD_{Sup}, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, on the 8th, 14th and 21st days of postnatal life. Anova Two-way, followed by Holm-Sidak, $p < 0.05$. § = C17 vs RBD_{Sup} and C17 vs RBD; # = RBD_{Sup} vs RBD; * = 8 vs 14 days and 14 vs 21 days. Data expressed in $\bar{x} \pm EP$.

The evaluation of the time during which the animal remained motionless during the recording period showed a progressive reduction in all the groups ($p < 0.05$) over the days studied. The C17 animals showed a longer motionless period than the RBD and RBD_{Sup} groups on the 21st day of postnatal life ($p < 0.05$) (Figure 7).

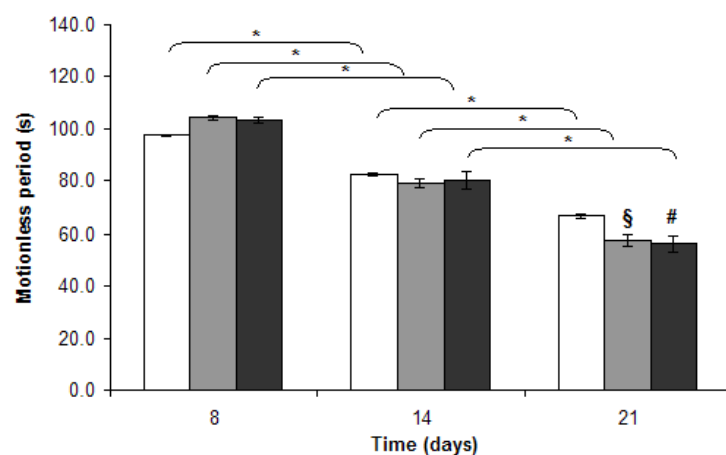


Figure 7 – Motionless period (s) of Casein 17% of protein (C17, white histogram) , Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD Sup, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, on the 8th, 14th and 21st days of postnatal life. Two-way Anova, followed by Holm-Sidak, $p < 0.05$. § = C17 vs RBD Sup; # = RBD Sup vs RBD; * = 8 vs 14 days and 14 vs 21 days. Data expressed in $\bar{x} \pm EP$.

The evaluation of the number of stops revealed no differences in the evolution of the C17 group. The RBD_{Sup} and RBD groups showed an increase in the number of stops between days 8 and 14 ($p < 0.05$), no difference being observed between days 14 and 21. In the comparison between the RBD_{Sup} and RBD groups with the C17 group, a reduction in the number of stops was observed only at the age of 8 days (Figure 8).

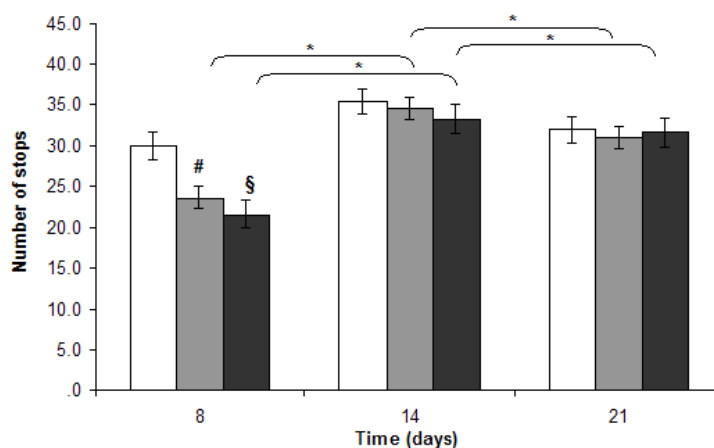


Figure 8 – Number of stops of Casein 17% of protein (C17, white histogram), Regional Basic Diet supplemented with casein to reach a level of 17% of protein (RBD_{sup}, gray histogram) and Regional Basic Diet 7,8% of protein (RBD, black histogram) rats, on 8, 14 and 21 days of postnatal life. Two-way Anova, followed by

Discussion

It is a well-known fact that animals submitted to hypoproteic diets during breast-feeding period show body weight reduction (Smart & Dobbing, 1971; Silvado & Werneck, 2006; Barros et al., 2006). Thus our findings are in accordance with those studies. In fact, DBR_{sup} animals showed a higher body weight than DBR animals. FAO/WHO (1991) recommends high protein level food supplementation to combat malnutrition. A weight increase in poor populations can be attained by essential amino acid consumption (Allen et al., 1991). Deficient diet supplementation is therefore an important instrument in combating the destructive effects of malnutrition (Teodósio *et al.*, 2000). This accounts for the differences in corporal mass between the groups in our study.

The average power developed by all nutritional groups increased gradually in the period studied, but there was a reduction in the 21-day-old malnourished animals, when compared to the C17 group. This fact may be explained as a consequence of the lower body mass, as well as a smaller cross-sectional area in the muscle, since the power developed by a body is directly proportional to its mass. Nutritional restrictions induced during the first postnatal week in pigs caused a reduction in the muscle cross-sectional area, but only of fast fibers, as seen in the lower back longissimus muscle (Lefaucheur et al., 2006). In rats submitted to malnutrition by the big litters method, the results were similar to the ones for the gastrocnemius muscle (Silvado & Werneck, 2006). The difference observed between the RBD_{Sup} and RBD groups is due to the greater availability of protein for the RBD_{Sup} thereby producing an increase in body mass (Schrier & Porath, 1965; Allen et al., 1991).

According to the parameters observed during this study, the pattern observed in the evolution of locomotor activity was similar in the different nutritional groups: there was a gradual increase in the distance covered and average speed of the developed movement, whereas the time during which the animal remained motionless during the recording time gradually decreased with age.

Nonetheless, it is important to point out that, on the day 14, the similarities in distance covered and average speed produced by RBD_{Sup} and C17 animals, where the two groups were superior to the RBD animals. Our results may reflect a minimised effect of malnutrition, in the RBD_{Sup} group, produced by protein supplementation. Barros et al (2006) demonstrated a delay in reflex ontogeny in malnourished animals. It is interesting to observe that reflexes consist of an initial motor experience in the neonate and contribute to the evolution of more mature motor patterns. Nagy et al (1977), for their part, observed an

increase in the locomotor activity of malnourished rats from the 17th postnatal day. Nonetheless, this finding was associated with a delayed maturation of the CNS structures that modulate expression of voluntary movement, which are said to act mainly act by inhibiting associated movements, that is, aiding the expression of orientated movements.

It is important to observe that there are findings on higher emotional instability in malnourished rats mentioned by Sobotka, Cook, & Brodie (1974) and Teodósio et al. (1979), who described an increase in the immobilization by fear responses and a decrease in dodge speed responses. These behavior alterations may potentially negatively influence the locomotor activity evolution pattern.

In the study by Teodósio et al. (1979) it was mentioned that malnourished rats showed different motor behaviour when compared to their nourished counterparts. The authors attributed such alterations to emotional behaviour modifications, with an increase in stress-related anticipation responses. In this way the rat shows an increase in voluntary movement without, however, definite a purpose or a directed locomotion (Teodósio et al., 1979). Malnourished animals would thus spend more time moving around but without showing an exploratory intention.

Conclusion

In our study it was possible to observe the benefits of protein supplementation of RBD on locomotor activity development in rats, during the neonatal period, which minimized the changes in somatic and locomotor development normally caused by malnutrition. Although mineral and vitamin deficiency produced alterations in the animals' development, protein supplementation was shown to be effective in combating malnutrition-related sequels.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES-COFECUB nº 417/01, CNPq nº 402149-0, Edital MCT-CNPq - 51/2005.

References

- Allen, L.H.; Black, A.K.; Backstrand, J.R.; Peltó, G.H.; Ely, R.D.; Molina, E., & Chavez, A. (1991). An analytical approach for exploring the importance of dietary quality versus quantity in the growth of Mexican children. *Food and Nutrition Bulletin*, 13, 95-105.
- Barros K.M.F.T., Manhães de Castro R., CABRAL FILHO J.E., MATOS R.J.B., SOUSA S.L., DEIRÓ T.C.B.J., & CANON F. (2006). A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional Neuroscience*, 9, 99-104.
- Eickmann, S.H., Lima, A.C.V., Guerra, M.Q., Lima, M.C., Lira, P.I., Huttly, S.R.A., & Ashworth, A. (2003). Improved cognitive and motor development in a community-based intervention of psychosocial stimulation in northeast Brazil. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 45, 536-541.
- FAO/WHO (1991). Protein Quality Evaluation. *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (Rome, Italy: UN Press), 66.
- Fox, M.W.(1965). Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Animal Behaviour*, 13, 234-241.
- Gramsbergen, A. (1998). Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development?. *Neuroscience Biobehaviour Reviews*, 22, 547-553.

- Lago E.S., Teodosio N.R., Araujo C.R., Azevedo M.C., Pessoa D.C., Campos F.A., Zucas S.M., & Flores H. (1993). Rat models of protein and protein-energy malnutrition. *International Journal For Vitamin And Nutrition Research*, 63, 52-56.
- Lefaucheur, L., Ecolan, P., Barzik, Y.M., Marion, J., & Le Dividich, J. (2003). Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. *Journal of Nutrition*, 133, 140-147.
- Nagy, Z.M., Porada, K.J., & Anderson, J.A. (1977). Undernutrition by rearing in large litters delay the development of reflexive, locomotor and memory processes in mice. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91(3), 682-696.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey, G.C. JR. (1993). 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. *Journal of Nutrition*, 123 (11), 1939-51.
- Schrier, K., & Porath, U. (1966). Influence of protein content of the diet on synthesis and break-down-rate of different organ proteins in the postnatal period. *Biology of the Neonate*, 9(1), 240-248.
- Silvado, C.E., & Werneck, L.C. (2006). Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle & Nerve*, 34, 72-77.
- Smart, J.L., & Dobbing, J. (1971). Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research*, 28(1), 85-95.
- Sobotka, T.J., Cook, M.P., & Brodie, R.E. (1974). Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Research*, 65, 443-457.

- Teodósio N.R., Filho J.E., Guedes R.C., Costa J.A., Ramos Costa F.B., & Da Silva A.T. (1979). Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta Physiologica Latinoamericana*, 29 (4-5), 255-262.
- Teodósio N.R., Perez E.P., Alves A.J., Dimenstein W., & Guedes R.C.A. (2000). A New Dietary Supplement Based on Bovine Blood: Recovering Brazilian Children from Malnutrition. *Nutritional Neuroscience*, 3, 73-86.
- Teodósio, N.R., Cabral-Filho, J.E., & Guedes, R.C.A. (1990). Regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition*, 40(4), 533-547.
- Walton, K.D.; Lieberman, D.; Llinás, A.; Begin, M.; Llinás, R.R. (1992). Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience*, 51, 763-767.



DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Discussão geral e conclusões

No Brasil, a desnutrição é um problema de saúde pública, enraizado em todas as regiões do país, e que pode ser encontrada tanto nas zonas urbanas como nas zonas rurais. Embora dados de órgãos governamentais revelem uma redução em seus índices de incidência nos últimos anos (FAO, 2000), a desnutrição, juntamente com as doenças a ela associadas, é responsável pela mortalidade de muitas crianças anualmente (UNICEF, 2006). Vale salientar que grande parte das crianças atingidas pela desnutrição consegue sobreviver, constituindo um grupo de indivíduos que são classificados como portadores de desnutrição pregressa (SANTOS et al., 1995).

Nos estudos realizados neste trabalho, foram discutidos alguns aspectos de como a desnutrição neonatal pode interferir no desenvolvimento neuromuscular e no controle motor do adulto. Ressaltamos que, no rato, o período neonatal corresponde a um período crítico do seu desenvolvimento nervoso, muscular e motor (WINICK & NOBLE, 1966; SILVADO & WERNECK, 2006; GRAMSBERGEN & WESTERGA, 1992) pela ocorrência de intensos processos estruturais. Assim o modelo de desnutrição neonatal pode ser considerado uma ferramenta útil para avaliarmos os efeitos de uma agressão nutricional ao desenvolvimento. É bem verdade que, em virtude da amplitude do nosso tema, dificilmente todos os elementos envolvidos neste processo poderiam ser abordados. Então, foram utilizadas técnicas que permitiram a avaliação do crescimento através de medida murinométrica e também de desenvolvimento da função neuromuscular e comportamental. Neste ultimo caso, foram avaliados, portanto, a evolução da excitabilidade reflexa (registro dos reflexos H e T) e da atividade locomotora.

No primeiro estudo deste trabalho, observamos redução no peso corporal devido à ocorrência da desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento (BARRETO-MEDEIROS et al., 2004). Efeitos persistentes da desnutrição neonatal têm sido observados sobre o crescimento em animais (DAVISON & DOBBING, 1968; DOBBING, 1970). A redução do peso corporal nos ratos desnutridos no período neonatal, em nosso estudo, perdurou até a idade adulta. Há uma aparente relação entre condições nutricionais no início da vida e suas conseqüências na idade adulta. WIDDOWSON & MCCANCE (1960) demonstraram o efeito permanente da nutrição neonatal sobre parâmetros murinométricos em ratos. Outros estudos têm também demonstrado que insultos sofridos durante o período de aleitamento podem induzir uma redução do crescimento em ratos (MORGANE et al., 1978; TEODÓSIO et al., 1990; BARROS et al., 2006).

A teoria dos períodos críticos para o desenvolvimento do SN auxiliou na compreensão dos efeitos irreversíveis da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento do cérebro (MORGANE et al., 1978). Além do mais, há agora um grande número de evidências epidemiológicas apontando a desnutrição durante a vida fetal e infância como fatores predisponentes dos indivíduos às doenças na idade adulta (RAVELLI et al, 1976, FORSDALL et al, 1977, BARKER et al, 1988, HALES & BARKER, 1992). Há inclusive uma proposição de que um estímulo ambiental ou insulto durante o período crítico do desenvolvimento pode ter um efeito permanente sobre a estrutura definitiva e suas funções no organismo, fenômeno chamado de programação (LUCAS, 1991).

A desnutrição neonatal também reduziu a excitabilidade reflexa em ratos ao desmame. Mudanças na amplitude dos reflexos H e T podem ser explicadas de três maneiras: 1- alteração na excitabilidade dos motoneurônios; 2- variação na quantidade de neurotransmissor liberado pelos terminais aferentes; ou 3- variações nas propriedades

intrínsecas dos motoneurônios (MISIASZEK, 2003; ZEHR 2002). Assim, alguns desses processos podem ser induzidos pela desnutrição. Além disso, ao nascimento, o processo de diferenciação dos tipos de fibras musculares não está completo, havendo uma maior proporção de fibras do tipo II do que fibras do tipo I (HO et al., 1983; WIRTZ et al., 1983). Em ratos, o músculo solear tem aproximadamente 73% de fibras do tipo IIa e 26% de fibras do tipo I nos 6° e 11° dias de idade. Entretanto, as fibras tipo IIa diminuem para 44% e as tipo I aumentam para 56% no 16° dia de idade. Esta rápida transição na composição das fibras continua e no 31° dia de idade, onde existe 25% de fibras tipo IIa e 74% das do tipo I (HO et al., 1983). Hennemen & Olson (1965) demonstraram que as fibras do tipo II são menos excitáveis que as do tipo I, pois as fibras do tipo I são inervadas por motoneurônios maiores. Assim, em parte, nossos resultados podem ser justificados por um possível atraso no processo de maturação das fibras musculares induzido pela desnutrição. Em acréscimo, estudos têm demonstrado que a desnutrição perinatal pode interferir na propagação do potencial de ação em ratos através de alterações produzidas sobre a bainha de mielina (SEGURA et al., 2004; 2001). Entretanto, não é conhecido como a desnutrição pode alterar as propriedades intrínsecas dos motoneurônios e o processo de transmissão sináptica entre o aferente Ia e o motoneurônio α .

Em particular, o reflexo T sofre influências da ativação dos motoneurônios fusiomotores γ sobre sensibilidade do fuso neuromuscular (PAILLARD, 1955). A manutenção do fuso neuromuscular em ratos se estende do período gestacional até as primeiras semanas de vida pós-natal (MILBURN, 1973; JIRMANOVÁ & SOUKUP, 1995). É possível que a desnutrição neonatal interfira no processo normal de maturação do fuso neuromuscular, agindo em moléculas importantes para o desenvolvimento do fuso

(TOURTELLOTTE et al., 2001). A desnutrição altera características musculares (SILVADO & WERNECK, 2006; CONDE MARTEL et al., 1998; WARD & STICKLAND, 1993) e pode modificar as propriedades viscoelásticas das estruturas músculo/tendinosas (RACK et al., 1984), o que modifica amplitude do reflexo T.

A ocorrência da desnutrição durante o desenvolvimento pode produzir alterações persistentes ou até mesmo irreversíveis no organismo, fato já demonstrado em numerosos trabalhos (SMART & DOBBING, 1971; NOBACK & EISENMAN, 1981; SEGURA et al., 2001; PAIXÃO et al., 2001; MORGANE et al., 2002). Na última década, os trabalhos sobre desenvolvimento têm focalizado sua atenção sobre o fenômeno da programação fetal (LUCAS, 1991). Há evidências da existência de uma 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 & BARKER, 2003). Segundo Hales & Barker (1992), o organismo tende a se adaptar favoravelmente a um ambiente agressivo. A desnutrição perinatal promoveria uma reprogramação do padrão metabólico do organismo, aumentando a resistência do organismo para um provável ambiente agressivo subsequente (BARKER, 1998). Esta hipótese fornece elementos para entender a origem de determinadas enfermidades, as quais tomaram proporções epidemiológicas (OZANNE & HALES, 1999). A relação entre as adaptações que ocorrem durante o período neonatal, e a eliminação do ambiente hostil na idade adulta, seria a base do aparecimento de doenças no adulto, como a diabetes tipo II e a hipertensão (RAVELLI et al., 1977, FORSDALL et al, 1978, BARKER et al., 1988). Esta idéia, embora elaborada para explicar mecanismos associados a desequilíbrios metabólicos, tem sido extrapolada para outros sistemas, como o muscular (VARDI & PINHAS-HAMIEL, 2000; SAYER & COOPER, 2005), mas ainda sem uma

determinação precisa dos seus mecanismos e consequências tardias. Hipoteticamente a agressão produzida pela desnutrição neonatal poderia alterar o sistema neuromuscular, para permitir maior chance de sobrevivência ao organismo durante a agressão nutricional, mas limitaria sua funcionalidade em um novo ambiente ausente do estímulo agressor.

O modelo experimental de desnutrição neonatal empregado em nosso estudo parece reproduzir com certa eficiência os elementos associados na “Hipótese do Fenótipo Protetor”, uma vez que o ambiente hostil produzido pela desnutrição durante o aleitamento é posteriormente substituído por um ambiente adequado, gerado pela recuperação nutricional imposta após o desmame. No Brasil, em relação à desnutrição, é possível inferir que as populações carentes têm obedecido a esta retórica (MONDINI & MONTEIRO, 1995). A melhora no poder aquisitivo da população brasileira mais carente, observada nos últimos anos, e a implementação de programas governamentais de assistência básica à saúde, podem refletir a transição de um ambiente nutricionalmente carente para outro em melhores condições (MONDINI & MONTEIRO, 1995; BATISTA FILHO M & RISSIN, 2003).

Nos resultados do segundo estudo neste trabalho foi acompanhada a maturação da excitabilidade reflexa de ratos desnutridos no período neonatal e recuperados após o desmame, para analisar a persistência dos efeitos da desnutrição sobre a resposta reflexa. Neste estudo, não foram identificadas alterações na excitabilidade reflexa dos animais desnutridos no aleitamento, não sendo possível afirmar a ocorrência de processos de programação sobre a evolução da amplitude dos reflexos. Entretanto, as alterações duradouras no peso corporal, na latência e no índice de velocidade de condução nervosa, sejam indícios favoráveis de que a influência fenotípica tenha ocorrido em parte no organismo dos animais (SAYER & COOPER, 2005).

A desnutrição demonstrou produzir uma redução na latência do reflexo H, revertida somente na idade adulta. Isto pode ser ocorrido por uma redução no comprimento do nervo ciático nos animais desnutridos, produzindo um menor percurso a ser desenvolvido pelo potencial de ação. Em humanos, tem sido demonstrado que o comprimento do nervo afeta claramente a latência do reflexo H (cruz martinez et al. 1983). Em crianças, foi observado uma redução progressiva na latência do reflexo H durante o primeiro ano de vida, seguido por subsequente aumento (prakash & bhatia, 1997). A diminuição durante os primeiros meses é explicada pelo aumento na velocidade de condução dos potenciais nervosos devido ao processo de maturação da bainha de mielina. uma vez que este processo se completa, a latência do reflexo H aumentou com o crescimento da criança. Stanley (1981) relatou uma redução na latencia do reflexo h e um aumento na velocidade de condução nervosa durante o crescimento da 4^o semana para 18 meses de vida em ratos sprague-dawley. Nós observamos também um aumento no índice d/l, indicativo da velocidade de condução nervosa em ambos os grupos, entretanto, este aumento foi menor no grupo desnutrido que no grupo controle. Todavia, a redução na latência do reflexo H menos a latência da resposta m, observada no grupo desnutrido, não pode ser atribuída a um aumento na velocidade de condução nervosa. O índice calculado em nosso estudo indica que os animais desnutridos têm uma redução na velocidade de condução nervosa, confirmada por prévios estudos que observaram a velocidade de condução ao longo do nervo ciático (da-silva et al. 1987) e outros nervos sensoriais (segura et al. 2004). Este efeitos sobre a velocidade de condução são atribuídos por alterações do desenvolvimento posnatal da bainha de mielina (segura et al. 2004). Nos dois estudos (da-silva et al. 1987, segura et al. 2004) os efeitos sobre a função nervosa dos desnutridos foram atribuídos a quantidade ou qualidade da dieta, especialmente em relação ao conteúdo de proteína. Entretanto, quando a desnutrição é

imposta somente a fase adulta, não ocorrem modificações na velocidade de condução (da-silva et al. 1987).

Outro ponto importante de nosso estudo foi o aumento progressivo da excitabilidade reflexa apresentado por normonutridos e desnutridos. Trabalhando com humanos, Vecchierini-Bliveau e Guiheneuc (1981) estudaram a amplitude do reflexo monossináptico em crianças. Eles observaram uma redução gradual na amplitude do reflexo H ao longo do primeiro ano de vida, seguida por um aumento até a idade de 4 anos. Entretanto, estes valores permaneceram menores aos observados em adultos. Em pré-adolescentes (7 a 11 anos de idade), foi observado que os valores da relação H_{max}/M_{max} não se alteram com a idade e não se diferenciam dos valores adultos (GROSSET et al. 2007). As alterações na amplitude do reflexo H no início da infância podem ser atribuídas aos processos de maturação do sistema nervoso, a mudanças nos processos pré-sinápticos inibitórios e na eficiência sináptica (PIERROT-DSEILLIGNY & MAZEVET, 2000; VECCHIERINI-BLIVEAU & GUIHENEUC, 1981). Em ratos, foi observado que a amplitude do reflexo H aumentou rapidamente entre o 1º e 5º mês de vida, durante a maturação do sistema nervoso periférico (HORT-LEGRAND et al. 2001). Assim, o aumento progressivo na excitabilidade reflexa observado pode corresponder a maturação das estruturas neuromusculares.

Vale destacar a importância da recuperação nutricional como um instrumento útil para combater a desnutrição e os efeitos de morbi-mortalidade por ela impostos. Em nosso estudo, independentemente do processo de programação, o sistema neuromuscular parece responder de uma maneira diferente aos impactos da desnutrição. A recuperação nutricional decerto produziu um efeito protetor sobre o organismo dos nossos animais, corrigindo de alguma forma as alterações neuromusculares produzidas pela desnutrição

neonatal. Os nossos achados são a favor dos efeitos benéficos da recuperação nutricional, uma vez que após sua realização, não mais se observou alteração na excitabilidade reflexa entre desnutridos e normonutridos. Foi dentro da perspectiva de intervir nutricionalmente para produzir alternativas viáveis de combate a desnutrição, que o terceiro estudo foi conduzido em nosso trabalho.

Neste terceiro estudo, observou-se que animais desnutridos no período neonatal, mas recebendo uma suplementação protéica, apresentam uma redução dos efeitos deletérios impostos pela desnutrição ao seu desenvolvimento. Estes achados confirmam as recomendações da FAO/WHO (1991) que preconizam o consumo de proteínas de alto valor biológico para combater a desnutrição. Barros et al. (2006), observaram que a desnutrição neonatal provoca um retardo no desenvolvimento da atividade locomotora. As melhoras nos parâmetros como: peso corporal, distância percorrida e potência muscular são evidências dos efeitos benéficos da suplementação protéica na dieta dos animais desnutridos.

De acordo com os parâmetros observados durante este estudo, o padrão verificado na evolução da atividade locomotora foi similar entre desnutridos e normonutridos. Houve um aumento gradual na distância percorrida e na velocidade média do movimento desenvolvido, considerando que o tempo durante o qual o animal permaneceu parado reduziu gradualmente com a idade.

Todavia, um importante ponto foi observado no 14^o dia, onde houve uma similaridade na distância percorrida e na velocidade média apresentada pelos suplementados e normonutridos, sendo ambos superiores aos desnutridos. Nossos resultados refletem uma minimização dos efeitos da desnutrição nos suplementados com proteína. Barros et al. (2006) demonstraram um atraso na ontogênese de reflexos em desnutridos. Isto é

interessante de ser observado uma vez que os reflexos representam a experiência motora inicial no neonato e contribui para evolução de padrões motores mais maduros. Nagy et al. (1977), por outro lado, observou um aumento na atividade locomotora em desnutridos no 17º dia pós-natal. Estes achados foram associados com um atraso na maturação das estruturas do sistema nervoso central que modulam a expressão voluntária dos movimentos. Existem achados que revelam uma maior labilidade emocional em ratos desnutridos, conforme relatado por Sobotka et al. (1974) e Teodósio et al (1979), que descreveram um aumento das respostas de imobilização por medo e diminuição na velocidade das respostas de esquiva. Estas alterações comportamentais podem potencialmente influenciar negativamente o padrão de evolução da atividade locomotora.

O desenvolvimento dos mamíferos compreende todas as mudanças contínuas que ocorrem desde a concepção ao nascimento, e deste à morte. Nesse período, surgem processos evolutivos, maturacionais e hierarquizados, no plano biológico intrínseco (genético, por exemplo), ou no plano de interação com o meio ambiente. A ocorrência da desnutrição durante o desenvolvimento pode produzir alterações persistentes ou até mesmo irreversíveis no organismo. A plasticidade neuronal, capacidade que os neurônios têm de formar novas conexões a cada momento, de certa forma, protege o indivíduo dessas intempéries. Esta característica intrínseca permite a recuperação gradativa das estruturas nervosas, constituintes também do sistema locomotor, após uma agressão ambiental, as quais podem chegar à idade adulta sem seqüelas. Por outro lado, haveria também uma outra forma de plasticidade, a genética, definida como a habilidade do genótipo em produzir mais de uma forma alternativa de estrutura, estado fisiológico e/ou comportamento. Assim, durante o desenvolvimento e em resposta às condições do meio ambiente, o organismo tenderia a se adaptar favoravelmente a um ambiente agressivo. Contudo, esta situação

promoveria uma reprogramação do padrão metabólico do organismo, aumentando sua resistência para um provável ambiente hostil subsequente. Esta seria a explicação de base para a origem de determinadas enfermidades, as quais tomaram proporções epidemiológicas. A relação entre as adaptações que ocorrem durante o período neonatal e a eliminação do ambiente hostil na idade adulta seria a base do aparecimento de doenças no adulto. Esta idéia, embora elaborada para explicar mecanismos associados a desequilíbrios metabólicos, tem sido extrapolada para outros sistemas, como o neuromuscular, mas ainda sem uma determinação precisa dos seus mecanismos e conseqüências tardias. A motricidade é, sem dúvida, uma atividade que caracteriza os mamíferos, permitindo-lhes tanto ajustar sua postura em função de suas necessidades de relacionamento com o mundo, como se movimentar neste mesmo mundo para deixar ambientes hostis; buscar locais que favoreçam sua sobrevivência, ou mesmo explorar o meio que os cercam. Para organizar estas atividades, o cérebro utiliza as informações obtidas através de seus sistemas sensoriais (tanto internos como externos). Por este motivo, existe uma íntima associação entre o desenvolvimento da motricidade e da capacidade de processamento sensorial. Nossos estudos ainda são incipientes para que possamos afirmar que um sistema tão importante para sobrevivência do animal durante todas as fases de sua vida não tenha mecanismos outros que possam lhe proteger de futuras seqüelas. Outrossim, não podemos negar a existência de mecanismos condizentes com a teoria do “programming”, uma vez que nossa abordagem nesse particular ainda é restritiva. Contudo, parece evidente nesse estudo que o sistema neuromuscular responde de uma maneira característica aos impactos da desnutrição. O retorno a um ambiente nutricional normal não salientou seqüelas, mas ao contrário corrigiu de alguma forma grande parte delas. Isso demonstra que o potencial plástico do sistema neuromuscular é resistente a programação, o que revela a importância

para a sobrevivência do animal a higidez do sistema que lhe permite o movimento e a postura. É pela importância que o sistema locomotor, por conseguinte a motricidade, assume na estruturação, organização e regulação do movimento e da postura que ele nos permite compreender a razão de ser da evolução decorrente do ato reflexo à atividade locomotora.

Assim, os resultados dos estudos realizados no presente trabalho nos permitem concluir que:

- Há uma redução na excitabilidade reflexa de ratos ao desmame, na ocorrência da desnutrição neonatal.
- Embora a desnutrição neonatal reduza a excitabilidade reflexa de ratos ao desmame, não ocorre alteração na maturação da excitabilidade reflexa se os animais forem submetidos à recuperação nutricional após o desmame.
- A suplementação de proteínas na dieta de ratos desnutridos promove uma redução dos efeitos deletérios da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento da atividade locomotora.

Além disso, podemos concluir que:

- Ocorre um aumento gradual na excitabilidade reflexa em ratos nos primeiros 90 dias de vida que independe da desnutrição neonatal.



PERSPECTIVAS

Com base em algumas questões levantadas neste trabalho que permaneceram sem uma adequada resposta e visando o aprofundamento do estudo, algumas perspectivas foram elaboradas no contexto da continuação deste trabalho

Assim, as perspectivas de continuação do presente trabalho são:

- Realizar estudos neuroquímico da sinapse que ocorre entre o aferente Ia e motoneurônio- α em ratos desnutridos.
- Averiguar os efeitos da desnutrição neonatal sobre as propriedades intrínsecas dos motoneurônios- α em ratos.
- Analisar histologicamente a presença de atraso no processo de diferenciação dos tipos de fibras musculares pós-natal de ratos desnutridos no período neonatal.
- Avaliar se ratos desnutrido no período neonatal apresentam alterações nas propriedades elásticas passivas dos músculos.
- Verificar os efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento do fuso neuromuscular.
- Continuar os estudos da maturação da excitabilidade reflexa em ratos desnutrido no período neonatal ao longo da vida.

- Avaliar os impactos de diferentes carências nutricionais (macro e micronutrientes) sobre a maturação da excitabilidade reflexa e atividade locomotora.
- Avaliar os efeitos da suplementação nutricional (macro e micronutrientes) em dietas carentes sobre a maturação da excitabilidade reflexa e atividade locomotora de ratos desnutridos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-FALAHE NA, & VALLBO AB. Role of the human fusimotor system in a motor adaptation task. *J Physiol* 401: 77-95, 1988.

ALLEN LH, BLACK AK, BACKSTRAND JR, PELTO GH, ELY RD, MOLINA E, & CHAVEZ A. An analytical approach for exploring the importance of dietary quality versus quantity in the growth of Mexican children. *Food and Nutrition Bulletin* 13: 95-105, 1991.

ALMEIDA-SILVEIRA MI, PÉROT C & GOUBEL F. Neuromuscular adaptations in rats trained by muscle stretch-shortening. *Eur J Appl Physiol* 72: 261-266, 1996.

ALMURSHED K & GRUNEWALD K. The effects of energy restriction on overloaded skeletal muscle in rats. *British Journal of Nutrition* 84: 697-704, 2000.

ANDERSON J, ALMEIDA-SILVEIRA MI & PÉROT C. Reflex and Muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J Exp Biol* 202: 2701 – 2707, 1999.

ANTONIO J & GONYEA WJ. Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med Sci Sports Exercice* 25: 1333 –1345, 1993.

BALDWIN KM & HADDAD F Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345-57, 2001.

BALICE-GORDON RJ, THOMPSON WJ: Synaptic rearrangements and alterations in motor unit properties in neonatal rat extensor digitorum longus muscle. *J Physiol* 398: 191-210, 1988.

BANKS, R. W. A histological study of the motor innervation of the cat's muscle spindle. *J Anat* 133: 571-591, 1981.

BATISTA FILHO M & RISSIN A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad de Saúde Pública* 19(1): 181-191, 2003.

BARKER D, EMONET-DÉNAND F, LAPORTE Y, PROSKE U ET STACEY MJ
Morphological identification and intrafusal distribution of the endings of static fusimotor axons in the cat. *J Physiol* 230: 405-427, 1973.

BARKER DJP. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 95: 115-128, 1998.

BARRETO-MEDEIROS JM, FEITOZA EG, MAGALHAES K, CABRAL-FILHO JE, MANHAES-DE-CASTRO FM, DE-CASTRO CM, MANHAES-DE-CASTRO R:
Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* 7: 49-52, 2004.

BARROS KMFT, MANHÃES DE CASTRO R, CABRAL FILHO JE, MATOS RJB, SOUSA SL, DEIRÓ TCBJ, CANON F: A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* 9: 99-104, 2006.

BEDI KS, BIRZGALIS AR, MAHON M, SMART JL, WAREHAM AC. Early life undernutrition in rats 1. Quantitative histology of skeletal muscle from underfed young and refed adult animals. *Br J Nutr* 47: 417, 1982.

BEINNER MA & LAMOUNIER JA. Recent experience with fortification of foods and beverages with iron for the control of iron-deficiency anemia in Brazilian children. *Food Nutr Bull* 24(3): 268-274, 2003.

BELLEMARE F, WOODS JJ, JOHANSSON R & BIGLAND-RITCHIE B Motor-unit discharge rates in maximal voluntary contractions of three human muscles. *J Neurophysiol* 50: 1380-1392, 1983.

BENEFICE, E.; FOUERE, T.; MALINA, R.M. Early nutritional history and motor performance of Senegalese children, 4-6 year of age. *Annals of Human Biology* 26: 443-455, 1999.

BENITEZ-BRIBIESCA, L.; DE LA ROSA-ALVARES, I.; MANSILA-OLIVARES, A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. *Pediatrics* 104: 21, 1999.

BENNETT M, HO S & LAVIDIS N. Competition between segmental nerves at end-plates in rat gastrocnemius muscle during loss of polyneuronal innervation. *J Physiol* 381: 351-76, 1986.

BISSONETEE DJ, MADAPLLIMATAM A & JEEJEEBHOY KN. 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* 66(2): 293-303, 1997.

BLATT GJ, CHEN JC, ROSENE DL, VOLICER L & GALLER JR. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Research Bulletin*, 34: 507-518, 1994.

BODY IA. The mechanical properties of dynamic nuclear bag fibres, static nuclear bag fibres and nuclear chain fibres in isolated cat muscle spindles. *Prog Brain Res* 44: 33-50, 1976.

BROOKE MH & KAISER KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23: 369-79, 1970.

BROWN MC, JANSEN JKS & VAN ESSEN D. Poly-neuronal innervation of the skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J Physiol* 261: 387-422 1976.

BURKE D. Effects of activity on axonal excitability: implications for motor control studies. *Adv Exp Med Biol* 508: 33-37, 2002.

BURKE RE Motor units: anatomy, physiology and functional organisation. In: Handbook of physiology, Sect. 1: The nervous system, vol. II; part 1, Brooks V.B. Ed. Bethesda, 345-422, 1981.

BURKE RE, LEVINE DN, ZAJAC FE, TSAIRIS P & ENGEL WK Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. Science 174: 709-712, 1971.

BURKE RE & EDGERTON VR. Motor unit properties and selective involvement in movement. Exerc Sport Sci Rev 3: 31-81, 1975.

CALANCIE B & BAWA P. Recruitment order of motor units during the stretch reflex in man. Brain Res 292: 176-8, 1984.

CANON F & GOUBEL F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. Pflugers Arch 429: 332-7, 1995.

CASTAINGTS V, MARTIN A, VAN HOECKE J & PÉROT C. Neuromuscular efficiency of the triceps surae in induced and voluntary contractions: morning and evening evaluations. Chronobiol Int 21: 631-43, 2004.

CAVALIERE MJ, DE ANGELIS RC, MACHA N & CAMPOS JV. Impaired differentiation of skeletal muscle fiber in developing undernourished rats. Boletim de Fisiologia Animal da Universidade de São Paulo 10: 69-78, 1996.

CHEN HH, HIPPENMEYER S, ARBER S & FRANK E: Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. Curr Opin Neurobiol 13: 96-102, 2003.

CHEN XY & WOLPAW JR: Circadian rhythm in rats H-reflex. Brain Res 648: 167-170, 1994.

CHOPRA JS. Neurological Consequences of Protein and Protein-Calorie. Neurobiology 6(2): 99 – 117, 1991.

CHRIST B & BRAND-SABERI B: Limb muscle development. *Int J Dev Biol* 46: 905-914, 2002.

CLAUS D, NEUNDORFER B & WARECKA K. The influence of vitamin B6 deficiency on somatosensory stimulus conduction in the rat. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 234(2): 102-105, 1984.

CONDE MARTEL A, GONZALEZ REIMERS E, GONZALEZ HERNANDEZ T, SANTOLARIA FERNANDEZ F, MARTINEZ RIERA A & MARCHENA GOMEZ J. Muscular changes in experimental protein malnutrition. *Nutr Hosp* 13: 309-311, 1998.

COOPER S & ECCLES JC The isometric response of mammalian muscles. *J Physiol* 69: 377-385, 1930.

CRAMER KS & VAN ESSEN DC. Maturation of fast and slow motor units during synapse elimination in the rabbit soleus muscle. *Developmental biology* 171: 16-26, 1995.

CRONE C, JOHNSON LL, HULTBORN H, & ORSNES GB. Amplitude of the maximum motor response (Mmax) in human muscle typically decreases during the course of an experiment. *Experimental Brain Research* 124: 265-270, 1999.

CROW MT & KUSHMERICK MJ. Chemical energetics of slow- and fast-twitch muscles of the mouse. *Journal of General Physiology* 79: 147-166, 1982.

CROWE A & MATTHEWS PBC. The effects of stimulation of static and dynamic fusimotor fibres on the response to stretching of the primary endings of muscle spindles. *J Physiol* 174: 109-131, 1964.

CRUZ MARTINEZ A, FERRER MT & MARTIN MJ. Motor conduction velocity and H-reflex in prematures with very short gestational age. *Electr Clin Neurophysiol* 23: 13 – 19, 1983.

DA-SILVA AT, COSTA FB, COSTA JA, TEODOSIO NR, CABRAL-FILHO JE & GUEDES RC. Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the northeast of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 20(3-4): 383-92, 1987.

DAVISON AN & DOBBING J: The developing brain. In: *Applied Neurochemistry* (Davison, A. N., & Dobbing, J., eds), Oxford: Blackwell,. p 253–286, 1968.

DE-DONCKER L, PICQUET F, BROWNE GB & FALEMPIN M. Expression of myosin heavy chain isoforms along intrafusal fibers of rat soleus muscle spindles after 14 days of hindlimb unloading. *J Histochem Cytochem* 50: 1543-1554, 2002.

DE- DONCKER L, KASRI M & FALEMPIN M. Soleus motoneuron excitability after rat hindlimb unloading using histology and a new electrophysiological approach to record a neurographic analogue of the H-reflex. *Experimental Neurology* 201: 368-374, 2006.

DE KONING P, NEUT JP, JENNEKENS FGI & GISPEN WH: Evaluation of cis-diamminedichloroplatinum (II) 5 cisplatin neurotoxicity in rats. *Toxicol. Appl Pharmacol* 89: 81-87, 1987.

DE LUCA CJ: The use of surface electromyography in biomechanics. *J appl Biomech* 13: 135-163, 1997.

DEIRÓ TCBJ; MANHAES-DE-CASTRO R, CABRAL-FILHO JE; SOUZA SL; FREITAS-SILVA SR; FERREIRA LMP; GUEDES RCA; CÂMARA CRV & BARROS KMFT. Neonatal treatment with citalopram delays the somatic maturation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37(10): 1503-9, 2004.

DESMEDT JE & GODAUX E. Ballistic contractions in man: characteristic recruitment pattern of single motor units of the tibialis anterior muscle. *J Physiol* 264: 673-693, 1977.

DESPLANCHES D, MAYET MH, SEMPORE B & FLANDROIS R Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol*. 63: 558-563, 1987.

DEWHURST S, RICHES PE, NIMMO MA, & DE VITO G. Temperature dependence of soleus H-reflex and M wave in young and older women. *European Journal of Applied Physiology* 94: 491-499, 2005.

DIFEE GM, CAIOZZO VJ, HERRICK RE & BALDWIN KM. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hind limb suspension. *Am J Physiol*. 29: 528-534, 1991.

DOBBING J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. *Proceedings of the Royal Society of London series B-Biological Sciences* 159, 1964.

DOBBING J: Undernutrition and the developing brain. *Am J D Child* 120: 411-415, 1970.

DOUTRELOUX JP *Physiologie et biologie du sport*. Edition Vigot. 230p, 1998.

DRACHMAN DB & JOHNSTON DM Development of a mammalian fast muscle: dynamic and biochemical properties correlated. *J Physiol*. 234: 29-42, 1973.

DREWETT, R.; WOLKE, D.; ASEFA, M. KABA, M & TESSEMA, F. Malnutrition and mental development: is there a sensitive period? a nested case-control study. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 42: 181-187, 2001.

DUCHATEAU J. Bed rest induces neural and contractile adaptations in triceps surae. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1581-1589, 1995.

DUCHATEAU J, SEMMLER JG & ENOKA RM. Training adaptations in the behavior of human motor units. *J Appl Physiol* 101: 166-1775, 2006.

DWYER CM & STICKLAND NC. Does the anatomical location of the muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *J Anat* 181: 373-376, 1992.

EARLES DR, JUDGE JO & GUNNARSSON OT Velocity training induces power-specific adaptations in highly functioning older adults. *Arch Phys Med Rehabil* 82: 872-8, 2001.

ECCLES JC, SCHMIDT RF & WILLIS WD. Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *J Physiol* 161: 282-29, 1962.

EDGERTON VR, SMITH JL & SIMPSON DR. Muscle fibre type population of uman leg muscles. *Journal of Histochemistry* 7: 259-266, 1975.

EDSTRÖM L & GRIMBY L. Effect of exercise on the motor unit. *Muscle Nerve* 9(2): 104-26, 1986.

EDSTRÖM L & LARSSON L. Effects of age on contratile and enzymehistochemical properties of fast-and slow-twitch single motor units in the rat. *J Physiol* 392: 129-145, 1987.

EICKMANN, S.H.; LIMA, A.C.V.; GUERRA, M.Q.; LIMA, M.C.; LIRA, P.I.; HUTTLY, S.R.A & ASHWORTH, A. Improved cognitive and motor development in a community-based intervention of psychosocial stimulation in northeast Brazil. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 45:536-541, 2003.

EINSIEDEL LJ & LUFF L. Alterations in the contractile properties of motor units within the aging rat medial gastrocnemius. *J Neurol Sci* 112: 170-177, 1992.

ELDER GCN & KAKULAS BA. Histochemical and contractile property changes during human muscle development. *Muscle and Nerve* 16: 1246-1253, 1993.

EMONET-DENAND F, LAPORTE Y, MATTHEWS PBC, & PETIT J. On the subdivision of static and dynamic fusimotor actions on the primary ending of the cat muscle spindle. *J Physiol* 268: 827-861, 1977.

ENOKA RM & FUGLEVAND AJ. Motor unit physiology: some unresolved issues. *Muscle & Nerve* 24: 4-17, 2001.

ERIKSSON PO, BUTLER-BROWNE GS, THORNELL LE. Immunohistochemical characterization of human masseter muscle spindles. *Muscle Nerve* 17(1): 31-41, 1994.

ERIM Z, DE LUCA CJ, MINEO K, & AOKI T. Rank-ordered regulation of motor units. *Muscle & Nerve* 19: 563-573, 1996.

ERLANGER J & GASSER HS. *Electrical Signs of Nervous Activity*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 1937.

ERTEKIN C, Mungan B & Uludag B. Sacral cord conduction time of the soleus H-reflex. *Journal of clinical Neurophysiology* 13: 77-83, 1996.

FAO/WHO. *Protein Quality Evaluation*. Food and Agricultural Organization of the United Nations (Rome, Italy: UN Press), p.66, 1991.

FAO. *Nutrition Country Profile – Brazil*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome, Italy: UN Press), p. 36, 2000.

FEINSTEIN B, LINDEGARD B, NYMAN E & WOHLFART G. Morphologic studies of motor units in normal human muscles. *Acta Anat (Basel)*. 23(2): 127-142, 1955.

FIOROTTO ML, DAVIS TA & REDES PJ. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278(4): 845-854, 2000.

FITTS RH, METZGER JM, RILEY DA & UNSWORTH BR. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* 60: 1946-1953, 1986.

FLESHMAN JW, MUNSON JB & SYPERT GW. Homonymous projection of individual group Ia-fibers to physiologically characterized medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* 46: 1339-48, 1981.

FOEHRING RC, SYPERT GW, & MUNSON JB. Properties of self-reinnervated motor units of medial gastrocnemius of cat. I. Long-term reinnervation. *Journal of Neurophysiology* 55: 931-946, 1986.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Nutrition Country Profiles. Brazil*. Roma: FAO, 2000.

FORSDAHL, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic disease? *Br J Prev Soc Med* 31: 91–95, 1977.

FOX, MW. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Animal Behavioral*. 13: 234-241, 1965.

FUKAMI, Y. Studies of capsule and capsular space of cat muscle spindles. *J Physiol* 376: 281-297, 1986.

FUMOTO M, KOMIYAMA T, & NISHIHIRA Y. Soleus H-reflex dynamics during fast plantarflexion in humans. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 12: 367-374, 2002.

GARNETT R & SPEPHENS JA. Changes in the recruitment threshold of motor units produced by cutaneous stimulation in man. *J Physiol* 311: 463-673, 1981.

GARNETT RAF, O'DONOVAN MJ, STEPHENS JA & TAYLOR A . Motor unit organization of human medial gastrocnemius. *J Physiol* 287: 33-43, 1979.

GERILOVSKY L, TSVETINOV P & TRENKOVA G. Peripheral effects on the amplitude of monopolar and bipolar H-reflex potentials from the soleus muscle. *Experimental Brain Research* 76: 173 – 181, 1989.

GHOSH S, VAND K, MOHAN M & MAHESHWARI MC. Effect of degree and duration of protein energy malnutrition on peripheral nerves in children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 24: 305, 1979.

GINET J, GUILHENEUC P, PREVOT M & JÄRVINEN M. Etude comparative du recrutement de la réponse réflexe monosynaptique du soléaire (réflex H) chez des sujets non entraînés et chez des sportifs. *Med Sport* 49: 55-64, 1975.

GIOUX M & PETIT J. Effects of immobilizing the cat peroneus longus muscle on the activity of its own spindles. *J Appl Physiol* 75: 2629-35, 1993.

GLADDEN MH. Structural features relative to the function of intrafusal muscle fibres in the cat. *Prog Brain Res* 44: 51-59, 1976.

GOODMAN MN, MCELENEY MA & RUDERMA NB. Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. *Am J Physiol* 241: 321-327, 1981.

GOULART F, VALLS-SOLÉ J & ALVAREZ R. Posture-related changes of soleus H-reflex excitability. *Muscle & Nerve* 23: 925-932, 2000.

GOZARIU M, ROTH V, KEIME F, LE BARS D & WILLER JC. Na electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Research* 782: 343-347, 1998.

GRAMSBERGEN A & WESTERGA J. Locomotor development in undernourished rats. *Behavioral Brain Research*, 48: 57-64, 1992.

GRAMSBERGEN A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development?. *Neurosci Biobehav Rev* 22(4): 547-53, 1998.

GRANIT R. The functional role of the muscle spindles--facts and hypotheses. Brain. Dec;98(4): 531-556, 1975.

GRANTHAN-MCGREGOR S, SCHOFIELD W & POWELL, C. Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-year follow up. *Pediatric* 79: 247-254, 1987.

GROSSET JF, MORA I, LAMBERTZ D & PEROT C: Changes in stretch reflexes and muscle stiffness with age in prepubescent children. *J Appl Physiol*, in press, 2007.

HALES CN & BARKER DJP: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601, 1992.

HALES CN & BARKER DJP: The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60: 5-20, 2001.

HALTIA M, BERLIN Ö, SCHUCHT H & SOURANDER P. Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibers in normal and undernourished rats. A histochemical and morphometric study. *J Neurol Sci* 36: 25-29, 1978.

HARTUNG V & ASMUSSEN G. Der influss des Lebensalters auf die extra- and intrafusalen muskelfasern im M soleus der ratte. *Z Mikrosk Anat Forsch* 102: 677-693, 1988.

HECKMAN CJ & ENOKA RM. Physiology of the motor neuron and the motor unit. In: *Clinical Neurophysiology of motor Neuron Diseases. Handbook of Clinical Neurophysiology*, Edited by Eisen A. New York: Elsevier, 4: 119-147, 2003.

HENNEMEN E & OLSON C B: Relations between structure and function in the desing of skeletal muscles. *J Neurophysiol* 28: 581-598, 1965.

HENNEMAN E & MENDELL LM Functional organisation of motoneuron pool and its inputs. In: *Handbook of physiology, Sect1: The nervous system, vol. II – part 1*. Brooks V.B. Ed, Bethesda, 423-507, 1981.

HENRIKSSON J. The possible role of skeletal muscle in the adaptation to periods of energy deficiency. *European Journal of Clinical Nutrition. European Journal of Clinical Nutrition* 44: 55-64, 1990.

HO KW, HEUSNER WW, VAN HUSS J & VAN HUSS WD: Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. *J Embryol Exp Morphol* 76: 37-49, 1983.

HOFFMANN P Über die Beziehung der Sehnenreflexe zur willkürlichen Bewegung und zum Tonus. *Z Biol* 68: 351-370, 1918.

HORT-LEGRAND C, LESTRADE R & BEHAR A Motor and sensory conduction velocities and amplitude of nerve or muscle potentials in the normal rat according to age. *Acta Physiol Hung* 88(3-4): 239-249, 2001.

HOWELLS KF, MATHEWS DR & JORDAN TC. Effects of pre- and perinatal malnutrition on muscle fibers from fast and slow rat muscles. *Res Exp Med* 173: 35-40, 1978.

HUGON M. Methodology of the Hoffmann reflex in man. In: *Progress in Clinical Neurophysiology, New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology*, edited by Desmedt JE. Basel, Switzerland: Karger, vol. 3, p 227-293, 1973.

HULLIGER M, MATTHEWS PB & NOTH J Static and dynamic fusimotor action on the response of Ia fibres to low frequency sinusoidal stretching of widely ranging amplitude. *J Physiol* 267: 811-838, 1977.

HULLIGER M, MATTHEWS PBC & NOTH J. Static and dynamic action on the response of Ia fibres to low frequency sinusoidal stretching of widely ranging amplitude. *Journal of Physiology* 267: 811-838, 1977a.

HULTBORN H, MEUNIER S, PIERROT-DESEILLIGNY E & SHINDO M Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *J Physiol*. 389: 757-772, 1987.

HULTBORN H, ILLERT M, NIELSEN J, PAUL A, BALLEGAARD M & WIESE H. On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Exp Brain Res* 108: 450-462, 1996.

HUNT CC. Mammalian muscle spindle: peripheral mechanisms. *Physiol Rev.* 70: 643-663, 1990.

HWANG IS. Assessment of soleus motoneuronal excitability using the joint angle dependent H reflex in humans. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 12: 361-366, 2002.

IVANOVIC DM, OLIVARES MG, CASTRO CG & IVANOVIC RM. Nutrition and learning in Chilean School Children: Chile's Metropolitan Region Survey 1986 - 1987. *Nutrition* 12: 122-129, 1996.

JAMON M & CLARAC F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behavioral Neuroscience* 112: 1218-1228, 1998.

JIRMANOVÁ I, SOUKUP T: Critical period in muscle splindle regeneration in grafts of developing rat muscles. *Anat Embryol* 192: 283-291, 1995.

JOHN BM, ROBERT C. FOEHRING, LORNE M. MENDELL & TESSA GORDON. Fast-to-Slow Conversion Following Chronic Low-Frequency Activation of Medial Gastrocnemius Muscle in Cats. II. Motoneuron Properties. *The American Physiological Society* 1997.

JOYCE GC, RACK PM & ROSS HF. The forces generated at the human elbow joint in response to imposed sinusoidal movements of the forearm. *Journal Physiology* 240, 351 – 374, 1974.

JOZSA L, KVIST M, KANNUS P & JARVINEN M. The effect of tenotomy and immobilization on muscle spindles and tendon organs of the rat calf muscles. A histochemical and morphometrical study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 76: 465-70, 1988.

KAMEN G, KOCEJA DM. Contralateral influences on patellar tendon reflexes in young and old adults. *Neurobiol Aging* 10(4): 311-315, 1989.

KAWASAKI Y, NAGANO M & INADA S. The reference values of the T-Wave of the patellar tendon reflex in normal dogs. *J Vet Med Sci* 66 (6): 659-664, 2004.

KELLY O, CUSACK S & CASHMAN KD. The effect of bovine whey protein on ectopic bone formation in young growing rats. *Br J Nutr* 90(3): 557-564, 2003.

KERNELL D. The adaptation and the relation between discharge frequency and current strength of cat lumbo-sacral motoneurons stimulated by long-lasting injected currents. *Acta Physiol Scand* 65: 65-73, 1965.

KHAN MA & SOUKUP T. Histochemical heterogeneity of intrafusal muscle fibres in slow and fast skeletal muscles of the rat. *J Histochem* 20(1): 52-60, 1988.

KUCERA J & WALRO JM. The effect of neonatal deafferentation or deafferentation on the immunocytochemistry of muscle spindles in the rat. *Neurosci Lett*. 95: 88-92, 1988.

KUCERA J & WALRO JM. Nonuniform expression of myosin heavy chain isoforms along the length of cat intrafusal muscle fibers. *Histochemistry* 92: 291-299, 1989a.

KUCERA J & WALRO JM. Postnatal expression of myosin heavy chains in muscle spindles of the rat. *Anat Embryol* 179: 369-376, 1989b.

KUCERA J & WALRO JM. Treatment with beta bungarotoxin blocks muscle spindle formation in fetal rats. *Development* 110: 483-489, 1990.

KUDINA LP & ALEXEEVA NL. After-potentials and control of repetitive firing in human motoneurons. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 85: 345-53, 1992.

KURUOGLU HR & OH SJ. Quantification of tendon reflexes in normal volunteers. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 33: 347-351, 1993.

KUZEKA K & ONTELL M. The Three-dimensional architecture of developing murine muscle spindles. *Dev Biol* 87: 133-147, 1981.

LAMBERTZ D, PÉROT C, KASPRANSKI R & GOUBEL F. Effects of long-term spaceflight on mechanical properties of muscles in humans. *J Appl Physiol*. 90: 179-188, 2001.

LAMBERTZ D, GOUBEL F & PÉROT C. A method to evaluate reflex excitability of the human ankle plantar flexors despite changes in maximal activation capacities. *Exp Brain Res* 143: 89 – 99, 2002.

LAMBERTZ D, GOUBEL F, KASPRANSKI R & PEROT C. Influence of long-term spaceflight on neuromechanical properties of muscles in humans. *J Appl Physiol* 94: 490-498, 2003.

LANDON DN. The fine structure of the equatorial region of developing muscle spindles in the rats. *J Neurocytol* 1: 189-210, 1972.

LANZ JKJR, DONAHOE M, ROGERS RM & ONTELL M. Effects of growth hormone on diaphragmatic recovery from malnutrition. *Journal of Applied Physiology*, 73: 801-805, 1992.

LARSSON L. Motor units: remodeling in aged animals. *J Gerontol* 50: 91-95, 1995.

LAURENTINO GEC, ARRUDA IKG, RAPOSO MCF & BATISTA-FILHO M. Short stature in school aged and under-five year-old children: a comparative analysis. *Reviews in Nutrition*, 19: 157-167, 2006.

LEE JK, JOHNSON CS & WRATHALL JR. Up-regulation of 5-HT₂ receptors is involved in the increased H-reflex amplitude after contusive spinal cord injury. *Experimental Neurology* 203: 502–511, 2007.

LEWIS MI & SIECK GC. Effect of acute nutritional deprivation on diaphragm structure and function in adolescent rats. *Journal of Applied Physiology* 73: 974-978, 1992.

LIDDELL EGT & SHERRINGTON CS. Recruitment and some others factors of reflex inhibition. *Proc Roy Soc B*. 97: 488-518, 1925.

LIU JX, ERIKSSON PO, THORNELL LE, & PEDROSA- DOMELLOF F. Fiber content and myosin heavy chain composition of muscle spindles in aged human biceps brachii. *J Histochem Cytochem* 53: 445- 454, 2005.

LUCAS A. Programming by early nutrition in man. In: *The Childhood Environment and Adult Disease*, pp. 38–55. CIBA Foundation Symposium 156. Wiley, Chichester, U.K. 1991.

LUCAS A, FEWTRELL MS & COLE TJ. Fetal origins of adult disease – the hypothesis revisited. *BMJ* 319 : 245-249, 1999.

LYNCH G, SMART JL & DOBBING J. Motor coordination and cerebella size in adult rats undernourished in early life. *Brain Research* 83: 249-259, 1975.

MACCABEE PJ, LIPITZ ME, AMASSIAN VE, CRACCO RQ & CADWELL JA. A new method using neuromagnetic stimulation to measure conduction time within the cauda equina. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 76 (3): 182-184, 1996.

MACELFIELD VG, FUGLEVAND AJ, & BIGLAND- RITCHIE B. Contractile properties of single motor units in human toe extensors assessed by intraneural motor axon stimulation. *J Neurophysiol* 75: 2509- 2519, 1996.

MAFFIULETTI NA, PENSINI M, SCAGLIONI G, FERRI A, BALLAY Y & MARTIN A. Effect of electromyostimulation training on soleus and gastrocnemii H- and T-reflex properties. *Eur J Appl Physiol* 90: 601-607, 2003.

MAGLADERY JW & MC DOUGAL DBJR. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. I-Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fibres. *Johns Hopkins Hosp Bull* 88: 265-290, 1950.

MAGLADERY JW, PORTER WE, PARK AM & TEASDALL RD. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. IV-The two-neurone reflex and identification of certain action potentials from spinal roots and cord. *Johns Hopkins Hosp Bull* 88: 499-519, 1951.

MAIER A & ELDRED E. Postnatal growth of the extra- and intrafusal fibers in the soleus and medial gastrocnemius of the cat. *Am J Anat* 141: 161-178, 1974.

MAIER A. Development and regeneration of muscle spindles in mammals and birds. *Int J Dev Biol* 41: 1- 17, 1997.

MARIEB EI. Anatomie et physiologie humaines. 6^{ème} Edition, Edition De Boeck Université, 2005.

MARINHO SMOC, TOSCANO AE, AFONSO LB, NEVES PRA, MORAES SRA & MANHAES-DE-CASTRO R. Desnutrição neonatal reduz neurônios do plexo mioentérico do colon descendente em ratos adultos. *Neurobiologia* 67: 138-143, 2004.

MASSION J. Postural control systems in developmental perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 22: 465-472, 1998.

MATTHEWS PBC. The response of de-efferented muscle spindle receptors to stretching at different velocities. *J Physiol* 168: 660-678, 1963.

MATTHEWS PBC. Muscle spindles and their motor control. Physiol Rev 44: 219-88, 1964.

MATTHEWS PBC. Evolving views on the internal operation and functional role of the muscle spindle. J Physiol 320: 1-30, 1981.

MC DONOUGH SM, CLOWRY GJ, MILLER S & EYRE JA. Reciprocal and Renshaw (recurrent) inhibition are functional in man at birth. Brain Res 899: 66-81, 2001.

MENDES DA SILVA C, LOPES SL, BARRETO-MEDEIROS JM, FREITAS SILVAS SR, COSTA ANTUNES DE, URBANO CUNHA AD, RIBAS VR, SIMÕES DE FRANÇA MF, NOGUEIRA MI & MANHÃES DE CASTRO R. Neonatal treatment whit fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. Arquivos de Neuro-Psiquiatria 60(4): 928-931, 2001.

MEUNIER S & PIERROT-DESEILLIGNY E. Gating of the afferent volley of the monosynaptic stretch reflex during movement in man. J Physiol 419: 753-63, 1989.

MILBURN A: The early development of muscle spindles in the rat. J Cell Sci 12:175-195, 1973.

MILBURN A. Stages in the development of cat muscle spindles. J Embryol Exp Morphol 82: 177- 216, 1984.

MISIASZEK JE: The H-reflex as a tool in neurophysiology: its limitations and uses in understanding nervous system function. Muscle Nerve 28: 144 – 160,2003.

MIWA T, MIWA Y & KANDA K. Dynamic and static sensitivities of muscle spindle primary endings in aged rats to ramp stretch. Neurosci Lett 201, 179-182, 1995.

MONDINI L & MONTEIRO CA. Mudanças no padrão de alimentação. In: velhos e Novos Males da Saude o Brasil: A evolução do país e de suas Doenças (C. A. Monteiro, org.), pp 79-89, São Paulo: Hucitec, 1995.

MONSTER AW & CHAN H Isometric force production by motor units of extensor digitorum communis muscle in man. *J Neurophysiol* 40: 1432-1443, 1977.

MORGANE PJ, 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 central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2: 137-230, 1978.

MORGANE PJ, AUSTIN -LAFRANCE R.J, BRONZINO JD, TONKISS J, DIAZCINTRA S, CINTRA L, KEMPER T & GALLER JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 17: 91-128, 1993.

MORITZ CT, BARRY BK, PASCOE MA, & ENOKA RM. Discharge rate variability influences the variation in force fluctuations across the working range of a hand muscle. *J Neurophysiol* 93: 2449-2259, 2005.

NAGY ZM, PORADA KJ & ANDERSON JA. Undernutrition by rearing in large litters delay the development of reflexive, locomotor and memory processes in mice. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91: 682-696, 1977.

NESTEL P, BRIEND A, DE BENOIST B, DECKER E, FERGUSON E, FONTAINE O, MICARDI A & NALUBOLA R. Complementary food supplements to achieve micronutrient adequacy for infants and young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36(3): 316-328, 2003.

NIELSEN L, CRONE C & HULTBORN H. H-reflexes are smaller in dancers from the Royal Danish Ballet than in well-trained athletes. *Eur J Appl Physiol*. 66: 116-121, 1993.

NIELSEN OB & CLAUSEN T. The Na⁺/K⁽⁺⁾-pump protects muscle excitability and contractibility during exercise. *Exercise Sport Sci Review* 28:159-164, 2000.

NOBACK C R & EISENMAN LM: Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *Anat Rec*; 201: 67-73, 1981.

O'BRIEN RA, OSTBERG AJ & VRBOVA G. Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 282: 571-82, 1978.

OCKEN DA & GRUNEWALD KK. The effects of exercise on catch-up growth of rats recovering from early undernutrition. *Journal of Nutrition* 118: 1410-1416, 1988.

OLIVEIRA F, Oliveira ASB, Schmidt B, & Amancio O MS. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1^a e 2^a gerações. *Jornal de Pediatria* 75(5): 350-356, 1999.

OVALLE WK & SMITH RS. Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in the cat and monkey based on the myosin ATPase reaction. *Can J Physiol Pharmacol* 50(3):195-202, 1972.

OZANNE SE & HALES CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Nutr Society* 58: 615-619, 1999.

PAILLARD J: Réflexes et régulations d'origine proprioceptive chez l'homme (Doutoral These). Arnette Ed., Paris, p 293, 1955.

PAILLARD T, NOE F & EDELINE O. Effets neuromusculaires de l'électrostimulation transcutanée surimposée et combinée à l'activité volontaire: une revue. *Annales de réadaptation et médecine physique* 48: 125-137, 2005.

PAIXÃO ADO, MACIEL CR, TELES MBB & FIGUEIREDO-SILVA J. Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biology of the Neonate*, 80: 239-246, 2001.

PARK KS, KIM SK, KIM MS, CHO EY, LEE JH, LEE KU, PAK YK & LEE HK. Fetal and Early Postnatal Protein Malnutrition Cause Long-Term Changes in Rat Liver and Muscle Mitochondria. *Journal Nutrition* 133(10): 3085-3090, 2003.

PEASE WS, KOZAKIEWICZ R & JOHNSON EW. Central loop of the H-reflex. Normal value and use in S1 Radiculopathy. *American journal of Physical Medicine and Rehabilitation* 76(3): 182-184, 1997.

PEDROSA-DOMELLÖF F, SOUKUP T, THORNELL LE. Rat muscle spindle immunocytochemistry revisited. *Histochemistry* 96(6): 327- 338, 1991.

PÉREON Y, THE TICH SN, FOURNIER E, GENET R & GUIHÉNEUC P. Electrophysiological recording of deep tendon reflexes: normative data in children and in adults. *Neurophysiologie Clinique* 34: 131-139, 2004.

PÉROT C, GOUBEL F & MORA I. Quantification of T- and H- responses before and after a period of endurance training. *European Journal of Applied Physiology* 63: 363-368, 1991.

PÉROT C & ALMEIDA-SILVEIRA MI The Human H and T reflex methodologies applied to the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 51: 71-76, 1994.

PÉROT C & ALMEIDA-SILVEIRA MI. The effects of hyperactivity on H and T responses in awake rats. In *Alpha and Gamma Motor Systems* (ed. A. Taylor, M.H. Gladden and R. Durbaba) pp, 118-120. New York, London: Plenum press. 1995.

PESSOA DCNP, LAGO ES, TEODÓSIO NR & BION FM: Dietary proteins on reproductive performance in there consecutive generations of rats. *Arch Latinoam Nutr* 50: 55-61, 2000.

PIERROT-DSEILLIGNY E & MAZEVET D. The monosynaptic reflex: a tool to investigate motor control in humans. Interests and limits. *Neurophysiol* 30, 67-80, 2000.

PRAKASH U & BHATIA BD. H-reflex latency: a maturity criterion for newborn babies. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 37: 435-437, 1997.

PROSKE U. The mammalian muscle spindle. *News Physiol Sci* 12: 37-42, 1997.

PUNKT K, NAUPERT A & ASMUSSEN G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. *Acta Histochemica* 106: 145-54, 2004.

PURVES, D. Neural activity and the growth of the brain. Cambridge: Cambridge University Press. 108 p. 1994.

RACK PMH, ROSS HF, THILMANN AF & WALTERS DKW: Reflex responses at the human ankle: the importance of tendon compliance. *J Physiol* 344: 503-524, 1983.

RACK PMH, WESTBURY DR. Elastic properties of the cat soleus tendon and their functional importance. *J Physiol* 347: 479-495, 1984.

RACK, PMH Stretch reflexes in man: the significance of tendon compliance. In: Feedback and motor control in invertebrates and vertebrates, Barnes WJP et Gladden M.H. ed., Croom Helm Ltd., London, chap.14: 217-229, 1985.

RAVELLI GP, STEIN ZA & SUSSER MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 295(7):349-53, 1976.

RAVELLI ACJ, VAN DER MEULEN JHP, MICHELS RPJ, OSMOND C, BARKER DLP, HALES CN & BLEKER OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* 351: 173 - 177, 1998.

REDFERN PA. Neuromuscular transmission in newborn rats. *J Physiol.* 209: 701-709 1970.

REISER PJ, MOSS RL, GIULIAN GG & GREASER ML. Shortening velocity and myosin heavy chains of developing rabbit muscle fibers. *Journal of Biological Chemistry* 260: 14403 - 14405, 1985.

RESNICK O: Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosc Biobehav Rev* 3: 233-246, 1979.

RIBOT-CISCAR E, ROSSI-DURAND C & ROLL JP. Increased muscle spindle sensitivity to movement during reinforcement manoeuvres in relaxed human subjects. *J Physiol* 523: 271-282, 2000.

ROSANT C, NAGEL MD & PÉROT C. Adaptation of rat soleus muscle spindles after 21 days of hindlimb unloading. *Experimental Neurology* 200: 191-199, 2006.

ROSANT C, NAGEL MD & PÉROT C. Aging affects passive stiffness and spindle function of the rat soleus muscle. *Exp Gerontology* in press, 2006.

RUDOMIN P. Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in mammalian spinal cord *TINS* 13: 499- 505, 1990.

SALAS M, FRIAS C, TORRERO C, REGALADO M & LORANCA A. Swimming and self-grooming development in pups nursed by neonatally underfed rats. *Growth, Development and Aging*, 62: 67–75, 1998.

SANES JK & LICHTMAN JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus *Nat ver Neurosci* 2: 791-805, 2001.

SANTOS LMP, ASSIS AMO, BARQUEIRO CM, QUAGLIA GMC, MORRIS SS & BARRETO ML. Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-arido da Bahia (Brasil): I.Avaliação antropométrica. *Rev Saúde Pública* 29(6): 463 –471, 1995.

SAYER AA & COOPER C. Fetal programming of body composition and musculoskeletal development. *Early Human Development*, 81: 735-744, 2005.

SCHIEPPATI M. The Hoffmann reflex: a means of assessing spinal reflex excitability and its descending control in man. *Prog Neurobiol* 28: 345-376, 1987.

SCHRIER K & PORATH U. Influence of protein content of the diet on synthesis and break-down-rate of different organ proteins in the postnatal period. *Biol Neonat* 9(1): 240-248, 1965-66

SCHWINDT PC. Membrane-potential trajectories underlying motoneuron rhythmic firing at high rates. *J Neurophysiol* 36: 434-439, 1973.

SCOTT JJ & YOUNG H The number and distribution of muscle spindles and tendon organs in the peroneal muscles of the cat. *J Anat.* 151: 143-155, 1987.

SCOTT JJ. Classification of muscle spindle afferents in the peroneus brevis muscle of the cat. *Brain Res.* 509: 62-70, 1990.

SEGURA B, GUADARRAMA JC, GUTIERREZ AL, MERCHANT H, CINTRA L & JIMÉNEZ I: Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci* 4: 475-488, 2001.

SEGURA B, GUADARRAMA JC, PRATZ G, MERCADO V, MERCHANT H, CINTRA L & JIMENEZ I. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci Letters* 354: 181-184, 2004.

SHARMA AK & THOMAS PK: Peripheral nerve structure and function in experimental diabets. *J Neurol Sci* 23: 1-5, 1974.

SILVA H J, BARROS KMFT, CUNHA DA, SANTOS F, SOARES E, Silva CNS, MORAES SRA & MANHÃES DE CASTRO R. Malnutrtion and somatic development: application of protocol of mensuration to evaluation of indicators of wistar rats. *International Journal of Morphology* 24: 469-473, 2006.

SILVADO CE & WERNECK LC. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle and Nerve* 34:72-77, 2006.

SIMONSE EB & DYHRE-POULSEN P. Amplitude of the human soleus H reflex during walking and running. *Journal of Physiology* 515(3): 929-939, 1999.

SINGH N, KUMAR A, & GHAI OP. Conduction velocity of moto nerves in children suffering from protein-calorie malnutrition and marasmus. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 16(4): 381-392, 1976.

SMART JL & DOBBING J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research.* 28:1, 1971.

SOBOTKA TJ, COOK MP & BRODIE RE. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Resarch.* .65: 443-457, 1974.

SOUKUP T. Intrafusal fibre types in rat limb muscle spindles: morphological and histochemical characteristics. *Histochemistry.* 47: 43-57, 1976.

STANLEY EF. Sensory and Motor Nerve Conduction velocities and the Latency of the H reflex during Growth of the rat. *Experimental Neurology* 71: 497- 506, 1981.

STEWART RJC, FREECE RF & SHEPPARD HG. Twelve generations of marginal protein deficiency. *Br J Nutr* 33: 223-253, 1975.

SUGIURA M & KANDA K. Progress of Age(related Changes in properties of motor units in the gastrocnemius muscle of rats. *J Neurophysiol* 92: 1357-1365, 2004.

SWASH N & FOX KP. The pathology of the human muscle spindle. Effect of denervation. *J Neurol Sci* 22: 1-24, 1974.

SWATLAND HJ. Fetal and neonatal development of spindle capsules and intrafusal myofibers in the porcine sartorius. *J Anim Sci* 39: 42- 46, 1974.

TEODÓSIO NR, FILHO JE, GUEDES RC, COSTA JA, RAMOS COSTA FB, & DA SILVA AT. Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta Physiologica Latinoamericana*, 29 (4-5), 255-262, 1979.

TEODÓSIO NR, PEREZ EP, ALVES AJ, DIMENSTEIN W & GUEDES RCA. A New Dietary Supplement Based on Bovine Blood: Recovering Brazilian Children from Malnutrition. *Nutritional Neuroscience*, 3: 73-86, 2000.

THOMAS CK, ROSS BH, & STEIN RB. Force-frequency relationships of human thenar motor units. *J Neurophysiol* 65: 1509-1516, 1991.

TOFT E. Mechanical and electromyographic stretch responses in spastic and healthy subjects. *Acta Neurologica Scandinavica*. 163: 2-24, 1989.

TOURTELLOTTE WG, KELLER-PECK C, MILBRANDT J, KUCERA J: The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interactions during muscle spindle morphogenesis. *Dev Biol* 232: 388-399, 2001.

TSURUIKE M, KOCEJA DM, YABE K & SHIMA N. Age comparison of H-reflex modulation with the Jendrassik maneuver and postural complexity. *Clin Neurophysiol*. 114: 945-53, 2003.

TURKER KJ & TÜRKER KS. Muscle spindle feedback differs between the soleus and gastrocnemius in humans. *Somatosensory and Motor Research*, 21: 189-197, 2004.

TUCKER KJ & TÜRKER KS. A new method to estimate signal cancellation in the human maximal M-wave. *Journal of Neuroscience Methods* 149, 31-41, 2005.

TUCKER KJ, TUNCER M, & TURKER KS. A review of the H-reflex and M-wave in the human triceps surae. *Hum Mov Sci* 24: 667-688, 2005.

UNICEF. The state of the world's children 2000. United Nations Children's Fund. Oxford University Press. New York. 2000.

UYSAL H, MOGYOROS I & BURKE D. Reproducibility of tendon jerk reflexes during a voluntary contraction. *Clin. Neurophysiol* 110: 1481- 1487, 1999.

VAN CUTSEM M, FEIEREISEN P, DUCHATEAU J & HAINAUT K. Mechanical properties and behaviour of motor units in the tibialis anterior during voluntary contractions. *Can J Appl Physiol* 22: 585-97, 1997.

VAN CUSTSEM M & DUCHATEAU J. Proceeding muscle activity influences motor unit discharge and rate of torque development during ballistic contractions in humans. *J Physiol* 562: 635-644, 2005.

VAN MEETEREN NL, BRAKKEE JH, HAMERS FP, HELDERS PJ & GISPEN WH: Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 78: 70-77, 1997.

VARDI P & PINHAS-HAMIEL O. The young hunter hypothesis: age-related weight gain – a tribute to the thrifty theories. *Medical Hypotheses*, 55: 521-523, 2000.

VECCHIERINI-BLINEAU MF & GUIHENEUC P. Excitability of the monosynaptic reflex pathway in the child from birth to four years of age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44, 309-314, 1981.

VOERMAN GE, GREGORIC M & HERMENS HJ. Neurophysiological methods for the assessment of spasticity: The Hoffmann reflex, the tendon reflex, and the stretch reflex. *Disability and Rehabilitation* 27(1/2): 33-68, 2005.

WALRO JM & KUCERA J. Comment on rat soleus muscle spindles. *J Anat.* 171: 259-266, 1990.

WALTON KD: Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience* 51: 763-767, 1992.

WARD SS & STICKLAND NC: The effect of undernutrition in the early postnatal period on skeletal muscle tissue. *Br J Nutr* 69:141-50, 1993.

WESTERGA J & GRAMSBERGEN A. Development of locomotion in the rat: the significance of early movements. *Early Hum Dev* 34(1-2): 89-100, 1993.

WIDDOWSON EM & MCCANCE RA. Some effects of accelerating growth I. General somatic development. *Proc R Soc Ser B* 152: 188–206, 1960.

WINEINGER MA, SHARMAN RB, STEVENSON TR, CARLSEN RC & MAC DONALD: Peripheral nerve and muscle function in the aging Fischer 344/brown-norway rat RB. *Growth, development & aging* 59: 107- 119, 1995.

WINICK M & NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *Journal of Nutrition* 89: 300 (abs.), 1966.

WIRTZ P, LOERMANS HMTH, PEER PGM & REINTJES AGM: Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in the mouse I. A histochemical and morphometrical investigation of normal muscle. *J Anat* 137: 109-126, 1983.

WITZEMANN V. Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* 326: 263-21, 2006.

WOLPAW JR. The complex structure of a simple memory. *Trends Neurosci.* Dec; 20(12):588-94, 1997.

WOLPAW JR & TENNISSEN AM. Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci* 24: 807-43, 2001.

ZEGERS DE BEYL D, DELECLUSE F, VERBANCK P, BORENSTEIN S, CAPEL P & BRUNKO E. Somatosensory conduction in vitamin B12 deficiency. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 69(4), 313-318, 1988.

ZEHR EP: Considerations for use of the hoffmann reflex in exercise studies. Eur J Appl Physiol, 86: 455-468, 2002.

ZELENA J. Development, degeneration and regeneration of receptor organs. Brain Research, 13: 175-213, 1964.



ANEXOS



A QUEM INTERESSAR POSSA

Declaramos para os devidos fins, que SEBASTIÃO ROGERIO DE FREITAS SILVA foi bolsista da CAPES, no período de 09/2004 a 08/2005 na UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE-FRANÇA, onde realizou Doutorado Sandwich em NUTRIÇÃO.

Brasília, 14/02/2007

Leonardo Osvaldo Barchini Rosa
Coordenador Geral de Cooperação Internacional

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 14/06

Recife, 20 de abril de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“DESNUTRIÇÃO NEONATAL E SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA: DESENVOLVIMENTO E EVENTUAIS CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS”**.

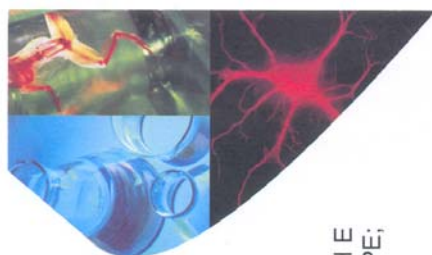
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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



XXI Reunião Anual da

FSBE

Federação de Sociedades de
Biologia Experimental

Certificamos que:

o resumo 05.051 DESNUTRIÇÃO NEONATAL: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS REFLEXOS H E T, EM RATOS. ¹Freitas Silva, S. R.; ²Perot C; ³Manhaes-de-Castro, R.; ⁴Barros, K. M. F. T. ^{1,3,4}Nutrição, UFPE; ²Engenharia Biomédica, CNRS foi apresentado sob a forma de painel na

**XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FSBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006**

Gerhard Malbec

Comissão Organizadora

2006



XXI Reunião Anual da
FESBE
Federação de Sociedades de
Biologia Experimental

Certificamos que:

o resumo 49.018 EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL UTILIZANDO UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS. ¹Freitas-Silva, S.R.; ²Barros, K. M. F. T.; ³Toscano, A.E.; ⁴Méio, L. A.; ⁵Aragão, R. S.; ⁶Manhaes-de-Castro, R.; ⁷Santos, W.P.; ⁸Portela, N.M.; ⁹Melo, C. H. S.; ¹⁰Costa da Silva, N.T.M.; ¹¹Souza, R.E. ^{1, 2, 3, 5, 6}Nutrição, UFPE; ⁴Fisioterapia, UFPE; ^{7, 8, 9, 10, 11}Física, UFPE foi apresentado sob a forma de painel na

XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006

Gerarda Malusc

Comissão Organizadora

2006

